

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



"Rol de RAC3 en la génesis tumoral"

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MÉDICAS
"ALFREDO LANARI"
IDIM-CONICET

Autor: Lic. Laura Carolina Panelo

Director de tesis: Dra. Mónica A. Costas
Consejero de estudios: Dr. Carlos Davio

2016

A mis padres Miguel Angel Panelo y Maria
Antonia Benavente

Resumen

RAC3 es un coactivador originalmente descrito como específico de receptores de hormonas esteroideas, con actividad acetilasa de histonas y la capacidad de remodelar la cromatina facilitando la expresión de genes blanco de estas hormonas. Se lo encontró sobre-expresado en tumores dependientes de las mismas y por esta razón se lo asoció a tumorigénesis hormono-dependiente. Sin embargo, años más tarde, nuestro grupo y otros investigadores hemos demostrado que RAC3 es un coactivador para otros factores de transcripción como NF- κ B aumentando su actividad transcripcional, así como la expresión de algunos de sus genes blanco que contribuyen a la tumorigénesis. Además, tiene otras funciones a nivel citoplasmático por las cuales contribuye al desarrollo tumoral de una gran variedad de tumores dependientes o no de hormonas, por las cuales hoy día se define como un oncogén. Su sobreexpresión tiene un rol inhibitorio de la apoptosis y la autofagia.

A diferencia de otros oncogenes conocidos, en el caso de RAC3, su rol oncogénico no depende de variantes por mutación, sino que, la sola sobreexpresión es suficiente. Consecuentemente, en células normales, no tumorales, su expresión es limitante y en ocasiones indetectable por técnicas habituales de determinación de proteínas. Sin embargo, es una molécula fácilmente detectada no solo en tumores, sino también en células madre embrionarias dado que recientemente se demostró que su expresión es necesaria para mantener el estado pluripotente.

A pesar de su sobreexpresión en múltiples tumores, en la mayoría de los casos no se debe a amplificación génica. Los mecanismos que controlan su expresión, así como la etapa en la ontogenia tumoral en la cual se disparan sus niveles no han sido completamente esclarecidos. Sin embargo, hemos demostrado previamente que la respuesta inflamatoria aumenta la transcripción del gen de RAC3 tanto *in vivo* como *in vitro*, sugiriendo que el microambiente inflamatorio tumoral podría contribuir en la regulación de su actividad oncogénica y por otro lado, la hipoxia inhibe su expresión. Numerosas evidencias sugieren la existencia de células madre tumorales. Estas serían las responsables de la génesis de tumores, la regeneración de los mismos cuando son trasplantadas, la formación de focos secundarios cuando se generan metástasis, una mayor resistencia a los tratamientos quimioterapéuticos y al igual que las células madre pluripotentes normales, mantendrían la capacidad de auto perpetuarse y dividirse de modo asimétrico generando la progenie tumoral.

Siendo RAC3 un factor necesario para mantener el estado pluripotente en células madre embrionarias y sobre-expresado en tumores, es posible que su alta expresión constituya un evento temprano en la ontogenia tumoral, independientemente

del tipo de tumor, ya sea por una expresión sostenida en caso que las células madre tumorales deriven de células madre normales, o bien, por re-expresión si derivan de células maduras diferenciadas.

El objetivo general de este trabajo de tesis fue determinar si el aumento en la expresión de RAC3 en células no tumorales podía inducir transformación tumoral con adquisición de un fenotipo de célula madre tumoral y en qué medida las señales inflamatorias podrían contribuir a esta acción oncogénica.

Brevemente, en este trabajo se demuestra que la sobreexpresión de RAC3 confiere a las células HEK293 la capacidad de crecer en condiciones limitantes de factores de crecimiento, lo cual podría atribuirse a la sobreexpresión de Ciclina E. Además aumenta la capacidad clonogénica e induce formación de tumor-esferas en suspensión. Compatible con un fenotipo de célula madre tumoral, la sobreexpresión de RAC3 aumenta la expresión de CD44 en la línea HEK293 y su sobreexpresión correlaciona con la *side population* CD133+ y CD44+ obtenidas a partir de células tumorales. También incrementa la expulsión de Hoechst en una vía sensible a bloqueo por Verapamilo, lo cual se asocia a la presencia de células con características de célula madre tumoral, con expresión aumentada de proteínas MDR. En este sentido, observamos que la sobreexpresión de RAC3 correlaciona con el aumento en la expresión de la proteína ABCG2 involucrada en la resistencia a multidroga en células tumorales. También observamos que la sobreexpresión de RAC3 inhibe la senescencia inducida por estrés genotóxico y metabólico y esta sobreexpresión es necesaria para el mantenimiento de la actividad telomerasa en células tumorales. La sobreexpresión de RAC3 está asociada a un fenotipo mesenquimático con aumento de la capacidad migratoria e invasiva. Esto involucra cambios morfológicos, de contacto célula-célula y célula-matriz y un cambio en el patrón de expresión de las proteínas Vimentina y Cadherinas además de la síntesis de metaloproteasas 2 y 9. La inoculación de células originalmente no tumorales HEK293 pero transformadas por sobreexpresión de RAC3 en ratones nu/nu, si bien induce el crecimiento de tumores *in vivo*, éstos no logran establecerse y perdurar en el tiempo. Esto podría ser consecuencia de su naturaleza benigna, o bien, del requerimiento de señales adicionales necesarias para su crecimiento, como por ejemplo el entorno inflamatorio. En este sentido, el estímulo con TNF *in vitro* potencia los efectos de sobreexpresión de RAC3 en la adquisición del fenotipo mesenquimático y la capacidad migratoria de células HEK293. Estas acciones biológicas son dependientes de la actividad IKK y correlacionan con la translocación de β -Catenina y el aumento en la actividad del

factor de transcripción TCF/LEF, cuya transactivación resultó dependiente de la actividad NF- κ B.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis demuestran que la sola sobreexpresión de RAC3 sería una señal suficiente para la transformación tumoral de células originalmente no tumorales HEK293 y que esta transformación se asocia a la adquisición de un fenotipo de célula madre tumoral y el entorno inflamatorio podría contribuir potenciando estos efectos.

Dado que las células madre tumorales serían las responsables de la génesis de tumores, la formación de focos secundarios cuando se generan metástasis y una mayor resistencia a los tratamientos quimioterapéuticos, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, contribuyen a una mejor comprensión y conocimiento de estos procesos, para el desarrollo futuro de mejores estrategias terapéuticas considerando el problema de latencia y recidivas.

Agradecimientos

Cuando me dicen, “*HAY QUE TENER VOCACIÓN PARA SER MAESTRO*”..... Yo siempre respondo: No! *HAY QUE TENER VOCACIÓN PARA SER CIENTÍFICO!!!*

No hay manera de hacer este trabajo sin una gran pasión, y me animo a dejar hasta el intelecto fuera de esta discusión. Porque, aunque muchos confundan la ciencia con capacidad intelectual, sin pasión y perseverancia no se llega a ninguna parte. Este trabajo de tesis, a pesar de todos los inconvenientes, ha representado para mí, la confirmación de que soy una apasionada por la ciencia y que no imagino mi vida sin leer un paper que me lleve a una idea, a un método y a una conclusión.

De mis padres recibí la educación y la determinación necesaria para luchar por mis sueños y para responder a mis cuestionamientos. Cuando tenía una pregunta, recuerdo a mi mamá diciéndome: yo no sé la respuesta, pero puedes buscarla en este libro, o en este, también puedes ir a la biblioteca. Yo me enojaba tanto, porque quería una respuesta rápida y sabía que ella la tenía. Sin embargo, lo que no sabía en ese momento, era que ella también tenía la paciencia necesaria para forjar mi curiosidad y para alentarme a buscar mis propias respuestas. Recuerdo a mi papá, tratando de no desarmarse a carcajadas cuando escuchaba mis argumentos, haciéndome dudar siempre sobre mis reflexiones y, yo, me enojaba nuevamente. Lo que no sabía en ese momento era que él estaba forjándose con un pensamiento crítico. De ellos he recibido mucho más que la vida, y eso ya es demasiado, recibí valores, los cuales considero el tesoro máspreciado que una persona puede tener. Y es por todo esto que este trabajo es dedicado principalmente a ellos. Gracias Miguel Angel y María Antonia por ser los padres que me han dado las herramientas y los valores necesarios para la vida, los recursos y el ejemplo que me llevaron a nunca bajar los brazos, que me valieron para poder llevar a cabo este trabajo y me servirán por el resto de mi vida.

Hablando de forjamiento, no puedo dejar de agradecerle a mi directora de tesis, la Dra. Mónica Costas, persona por demás capaz, pero por sobre todo con increíbles valores, de esos que se perciben hasta en una corta entrevista. Gracias Moni, vos no solo me diste la oportunidad de trabajar en tu laboratorio y formarme como profesional, casi como una madre, tuviste la grandeza de escucharme, de alentarme y de cuidarme. Te preocupas por nosotros, siempre, aún por aquellos que no te respondieron con honestidad, y eso solo es posible si se valora a las personas más que a sus ofensas. Desde lo profesional, gracias por escuchar mis ideas y por valorarlas. Por las veces que te dije: ¡Moni mira lo que leí! y vos, aún agobiada por mi demanda, siempre me escuchaste. Por enseñarme a construir una línea de pensamiento, ordenando la información que, como buenos becarios, tenemos bien desordenada. Gracias Moni por haber confiado en mí y haberme dado grandes oportunidades para desafiarme profesionalmente.

Gracias a mis compañeros del laboratorio, fueron muchos pero con los que más conviví fueron: Ceci, Fer y Nico. Desde lo personal, gracias por las risas, las

charlas de café, los días de asado y las charlas humanas. Las discusiones internas sobre lo que está bien o lo que está mal.

Los compañeros también te forjan profesionalmente, y ustedes han sido muy importantes en mi formación. Nico, gracias por tu pensamiento crítico, sos de esas personas que llevan la ciencia en la piel, en las palabras y en las ideas, siempre con un criterio inapelable y que tomo como ejemplo. Fer, me has ayudado mucho, sobretodo, me ayudaste a crecer personalmente y eso es grandioso. Ceci, gracias por tu buena onda, de esa que se percibe a Km de distancia, nuestra convivencia fue corta, pero en esa corta experiencia me dejaste algo en claro, ¡SE PUEDE!

Gracias a la Universidad de Mar del Plata por formarme en mi carrera de grado. Gracias a la Universidad de Buenos Aires por aceptarme para hacer mi Doctorado. Gracias a CONICET por otorgarme las becas de postgrado. Gracias a mi consejero de tesis Dr. Carlos Davio, que hace todo lo que está a su alcance y responde a mis e-mails como si estuviera a mi lado.

Mi suerte no se limitó a mi laboratorio, el Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari tiene grupos de investigación increíbles. Con personas, por demás capaces, que siempre quieren colaborar y eso es impagable.

Gracias al grupo de Tripanosoma, Mariana, Meli, Favio, Eduar, Chantal y Claudio. Gracias chicos, siempre predispuestos a ayudar. Desde cómo hacer bacterias ultracompetentes, hasta clonado de oligos, PCR, etc. ¡Gracias Marian por los anticuerpos secundarios!. Siempre decimos que somos casi del mismo grupo. Ustedes suben, nosotros bajamos y así es la dinámica, solemos usar la frase “¿me prestan?” casi como una simple formalidad porque nunca existió un no, no tenemos o nos queda poco, jamás. Gracias

Gracias al grupo de Bachi, Gabi por ayudarme con los experimentos de cicatrización de la Herida. Luciano por las largas charlas de la dinámica del citoesqueleto, canales iónicos y ciencia en general. Ale, en breve seremos compañeras de lab y estoy muy contenta por ello. Gracias por las charlas, los mates y la compañía.

Gracias al grupo de Hematología Experimental, Felisa, Rosana, Paola, Paula, Nora, Any y los becarios Ceci, Yesi y Mati. Como un factor común, se repite y se repite, personas que cuando necesitas algo, siempre están dispuestas a colaborar, ideas, reactivos, equipamiento.....TODO. ¡Gracias!

Gracias al grupo de Riñón Experimental, en especial a Pablito por toda su colaboración y predisposición. Gracias por responder a la típica frase: “voy a riñón, ellos deben saber” Gracias

Gracias a la Dra. Cristina Aguirre jefa de la unidad de Nefrología del Hospital Lanari, una médica apasionado por la ciencia, que siempre quiere colaborar y nos ha ayudado en todo.

Gracias a las secretarias del Instituto Jesy y Marga, ¡las quiero!

La buena suerte se extendió a otros institutos

Gracias al Instituto Angel Roffo en especial a Alejandro Urtreger y María Inés Días Bessone por las ideas y por ayudarme con los experimentos de invasión y las zimografías, fueron de gran ayuda.

Gracias a Elva Vázquez y Felipe Jaworsky de Facultad de Exactas por ayudarme con los experimentos in vivo, las ideas, la experiencia y la buena predisposición de siempre. ¡Gracias!

Gracias a Georgina Coló, de quien he aprendido muchísimo y le agradezco infinitamente la oportunidad profesional que me ha dado.

Llega el turno de los que están ahí calladitos, sin entender nada de lo que hacemos, pero eso sí, a la hora de alentar, están ahí dispuestos a sostenerte en cuerpo y alma hasta que consigas tu objetivo. Ellos son los hermanos de sangre y los hermanos de la vida ¡los amigos!.

A mis hermanos de sangre: Pablo, Inés, Andrés y Silvia “Los Paneles” (como nos llaman los amigos) y a mis primos Gonza y Pamela. Son una voz de aliento constante, pero esa virtud va más allá de las palabras, sus propias vidas son mi aliento. Porque me conocen hasta las entrañas y siempre han velado por mi revolución, ¡gracias! Sin hacer distinción, quiero hacer una mención a mi hermana Silvia, quien tiene relación directa con mi doctorado ya que se ha encargado de trámites y papeleos desde que me presenté a la beca de CONICET, cuando aún vivía en Mar del Plata, y sobre el final siguió aportando su gran ayuda, gracias Chu, sos incondicional.

No puedo dejar de agradecerles a mis cuñados y cuñadas, ellos también colaboraron y me alentaron. Gracias ¡Juancho y Mario! Me cuidan tanto como cuidan de mis hermanas, los valoro mucho porque son grandes personas y aunque nunca vamos a poder ponernos de acuerdo políticamente..... jejeje, sé que bancan y respetan los planteos de la cuña zurda. A mis ex cuñadas Vero y Andrea, casi mis hermanas, las amo, siempre me han alentado y se sienten orgullosas de mis logros, aprendo de ustedes y les agradezco infinitamente los valores que han inculcado en mis sobrinos.

A mis hermanos de la vida, mis amigos! Nadia, Debo, Andre, Ceci, Romi, Jime, Patito, Curcu, Luisma, Leo, Marina, Geo, Pato, Fer, Monky, Olguis, Yani, Maru, Sebas, Asunción, Rafa y espero no estar olvidándome de nadie ¡Gracias! por estar ahí, por seguir a mi lado a pesar de la distancia y por aguantarme desde hace tantos años!. Vale un WP con cara triste para que surjan esos leones que a cada rato me recuerdan ¡LO VAS A LOGRAR! Y que me dicen, aquí estamos cada vez que vengas a Mardel, siempre te estamos esperando. Me llenan de orgullo chicos, ¡los amo!

Gracias a mis sobrinos, Tomás, Martín, Ezequiel, Lucía, Santiago, Franco, Ludmila, Agustina y Lautaro. Ustedes son mi esperanza. Siento orgullo cuando los escucho hablar y descubro esos corazones bellos y llenos de valores. Espero ser siempre un ejemplo y una influencia positiva en sus vidas, ¡los amo!

Indice

Resumen	2
Agradecimientos	5
Tablas	12
Figuras	12
Abreviaturas	15
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1 El cáncer	17
1.1) A- Mantenimiento de las señales proliferativas	18
1.1) B- Evasión de los mecanismos supresores del crecimiento	20
1.1) C- Inmortalidad y senescencia	22
1.1) D- Resistencia a la muerte celular: apoptosis, autofagia o necrosis	28
1.1) E- Activación del proceso metastásico	34
1.1) F- Inducción de la angiogénesis	37
1.1) G- Microambiente tumoral: la inflamación en la génesis y progresión tumoral	38
1.2 Teorías sobre la heterogeneidad tumoral	41
1.2) A- Modelo de evolución clonal	42
1.2) B- Modelo de Células Madre Tumorales	42
1.3- Conceptos básicos sobre células madre	44
1.4- Evidencias que sustentan el modelo de célula madre tumoral	46
1.5- Señales involucradas en la autorrenovación y diferenciación de SC y CMT.	47
1.5) A- Cascada de transducción de señal de TNF/NF- κ B	47
1.5) B- Cascada de transducción de señal Wnt/ β -Catenina	50
1.6- Métodos para la Identificación de células madre cancerígenas	52
1.7- Coactivadores de receptores nucleares, familia p160	54
1.7) A- Estructura general de los SRC's	55
1.8- RAC3	56
1.8) A- Rol fisiológico de RAC3: modelo de ratón RAC3-deficiente	57
1.8) B- Caracterización y modo de acción de RAC3	57
1.8) C- RAC3 no es solo un coactivador de receptores nucleares	59
1.8) D- Localización subcelular de RAC3	59
1.9- RAC3 un oncogén	61
1.9) A- Modelo de ratones transgénicos de RAC3	61

1.9) B- RAC3 se encuentra en altos niveles en una amplia gama de tipos tumorales.....	62
1.10- Rol de RAC3 en el desarrollo tumoral	67
1.10)A- RAC3, ciclo celular y supresores tumorales	67
1.10) B- Resistencia a la muerte celular: RAC3 protege de la apoptosis	69
2- RAC3 y el mantenimiento de características Stem Cell	70
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	72
Hipótesis.....	74
Objetivo general.....	75
Objetivos específicos	75
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	77
3.1- Modelo experimental	78
3.2- Metodología utilizada para los experimentos con estímulo inflamatorio	80
3.3- Mantenimiento de las líneas celulares	81
3.4- Vectores de expresión y plásmidos reporteros	82
3.5- Transfección de Células en cultivo	82
3.5) A- Transfección por el método de cloruro de calcio	82
3.5) B- Transfección utilizando el reactivo <i>FUGENE HD</i> (siguiendo las recomendaciones del fabricante).	83
3.6- Experimento de proliferación en ausencia de factores de crecimiento	84
3.8- Ensayo de exclusión de Hoechst 33342.....	84
3.9- Ensayo de formación de colonias.....	84
3.10- Ensayo de formación de tumor-esferas.....	85
3.11- Formación de esferoides.....	85
3.12- Adhesión dependiente de E-Cadherina.....	85
3.13- Ensayo de adhesión.....	86
3.14- Ensayo de migración/invasión por la técnica de <i>transwell</i>	86
3.15- Ensayo de cicatrización de la herida	87
3.16- Detección de actividad metaloproteasa.....	87
3.17- Determinación de las dosis óptimas H ₂ O ₂ y Rapamicina como estímulo genotóxico.....	88
3.18- Ensayo de actividad SA:βGal-ácida para la observación de senescencia .	88
3.19- Ensayo de tinción con Hoechst para la observación de núcleos grandes...	88
3.20- Ensayo de proliferación y senescencia	89
3.21- Evaluación del ciclo celular por cartometría de flujo	89
3.22- Ensayo de actividad telomerasa	89

3.23-	Ensayo de inmunofluorescencia (IF)	90
3.23-	Determinación de niveles de proteínas por Western Blot	90
3.23)	A. preparación de extractos proteicos.....	90
3.23)	B- electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (sds-page) y transferencia a membrana	91
3.23)	C- ensayo de <i>western blot</i> (WB)	92
	Anticuerpos utilizados	93
3.24-	Determinación de mRNA por RT-qPCR	93
3.24)	A- extracción de RNA	93
3.24)	B- amplificación de cDNA por RT-qPCR	94
	Tabla con secuencias de primers	95
3.25-	Análisis de expresión de genes reporteros.....	95
3.25)	A- cosecha de células y preparación de extractos	95
3.25)	B- detección de actividad Luciferasa.....	95
3.25)	C- medición de actividad β -galactosidasa	96
3.26-	Modelo experimental <i>in vivo</i>	96
3.27-	Análisis bioinformático	97
3.28-	Análisis estadístico	97
4.	RESULTADOS	98
Parte I	99	
4.1-	La sobreexpresión de RAC3 es un factor transformante.....	99
4.1)	A- RAC3 favorece la proliferación independiente de factores de crecimiento	99
4.1)	B- La sobreexpresión de RAC3 promueve la expresión de marcadores stem tumoral	101
4.1)	C- RAC3 aumenta la capacidad clonogénica y la formación de tumor-esferas	106
4.2-	Otras evidencias de transformación tumoral por sobreexpresión de RAC3.....	108
4.2)	A- La sobreexpresión de RAC3 favorece la formación de esferoides.....	108
4.2)	B- La formación de esferoides es independiente de E-Cadherina.....	110
4.2)	C- La formación de esferoides activa NF- κ B	112
4.3-	La sobreexpresión de RAC3 induce la expresión de un fenotipo mesenquimático	113
4.4-	La sobreexpresión de RAC3 aumenta la capacidad migratoria e invasiva	116
4.4)	A- La sobreexpresión de RAC3 aumenta la capacidad migratoria	117
4.4)	B- La sobreexpresión de RAC3 induce la actividad MMP2	118
4.4)	C- La sobreexpresión de RAC3 aumenta la capacidad invasiva	118

Parte II	120
4.5-	Rol de RAC3 en la senescencia celular 120
4.5) A-	El tratamiento con H ₂ O ₂ y Rapamicina inducen senescencia prematura en células HEK293 120
4.5) B-	La concentración de H ₂ O ₂ y Rapamicina utilizadas inducen un arresto en fase G1 del ciclo celular..... 123
4.6-	La sobreexpresión de RAC3 protege a las células HEK293 de la senescencia prematura 123
4.6) A-	La sobreexpresión de RAC3 inhibe la expresión de p21 inducida por H ₂ O ₂ o Rapamicina..... 124
4.6) B-	La sobreexpresión de RAC3 inhibe la translocación de p21 y p16 a núcleo 125
4.6) C-	La sobreexpresión de RAC3 inhibe la translocación de p53 a núcleo 126
4.7-	La sobreexpresión de RAC3 es necesaria para la proliferación y el mantenimiento de la actividad telomerasa en células tumorales 127
4.8-	Células originalmente no tumorales adquieren por sobreexpresión de RAC3 la capacidad de generar tumores <i>in vivo</i> 129
4.9-	Contribución del microambiente inflamatorio a los efectos inducidos por sobreexpresión de RAC3 132
4.9) A-	La sobreexpresión de RAC3 es necesaria para que TNF induzca TEM. 132
4.9) B-	Efecto de TNF sobre la migración inducida por sobreexpresión de RAC3 136
4.9) C-	Efecto de TNF sobre la actividad MMP inducida por sobreexpresión de RAC3..... 138
4.10-	La sobreexpresión de RAC3 en un contexto inflamatorio favorece la actividad de NF- κ B y β -Catenina 140
4.10) A-	Efecto de TNF sobre los niveles β -Catenina cuando RAC3 esta sobre-expresado..... 140
4.10) B-	La sobreexpresión de RAC3 induce la translocación de β -Catenina a núcleo bajo el estímulo con TNF..... 141
4.10) C-	Cinética de translocación de β -Catenina con el estímulo de TNF..... 144
4.10) D-	La sobre expresión de RAC3 aumenta la actividad transcripcional de β -Catenina 145
5.	DISCUSIÓN..... 149
6.	CONCLUSIONES 168
	Bibliografía..... 172

Tablas

Tabla 1: Principales oncogenes involucrados en el desarrollo de cancer

Tabla 2: Principales genes supresores tumorales mutados en cáncer.

Tabla 3: marcadores de células madre tumorales.

Tabla 4: Niveles de RAC3 en tumores hormono respondedores.

Tabla 5: Niveles de RAC3 en tumores hormono independientes.

Figuras

Figura 1: Requerimientos para la generación de una neoplasia.

Figura 2: Fases del ciclo celular y sus reguladores

Figura 3: Límite de Hayflick.

Figura 4: Longitud de telómero vs. número de divisiones celulares.

Figura 5: La senescencia puede producirse por acortamiento telomérico o por distintas señales no teloméricas, como daño al DNA, señales de estrés, y señales oncogénicas.

Figura 6: Tinción con Hoechst células Wi38, proliferando o en células con senescencia replicativa.

Figura 7: Actividad SA: β GAL ácida en células Wi38, proliferando o en células con senescencia replicativa.

Figura 8: Vías apoptóticas intrínseca y extrínseca.

Figura 9: Proceso autofágico para la obtención de energía. Adaptado de (Mendez et al 2009).

Figura 10: Relación entre apoptosis y autofagia en la tumorigénesis

Figura 11: La vía mTOR y la multiplicidad de señales que censa, vías que activa e integra. Adaptado de <http://flipper.diff.org/app/pathways/595>.

Figura 12: Principales diferencias entre las distintas formas de muerte celular.

Adaptado de www.imgenex.com

Figura 13: Cascada metastásica. Adaptado de “slideshare.net/basmedblog/12-βiologa-y-marcadores-tumorales”

Figura 14: Inducción de la angiogénesis. Adaptado de Vascular targeting agents. Horizons in Cancer Therapeutics. (Sieman et al, 2002)

Figura 15: Adaptado de “Cancer-related inflammation” (Mantovani et al., 2008)

Figura 16: Modelo de Célula Madre tumoral y Modelo de expansión clonal.

Figura 17: Vías de activación de NF- κ B. *La vía canónica* es activada por señales inflamatorias como citoquinas pro-inflamatorias y LPS bacteriano

Figura 18: Ruta de señalamiento Wnt/ β -Catenina. Adaptado de "bioquimica.uab.es

Figura 19. RAC3 es coactivador del Factor de transcripción no esteroideo NF- κ B.

Figura 20. Esquema representativo de las diferentes fases del ciclo celular. Cdk: kinasas dependientes de Ciclina; Rb: retinoblastoma, Fases: S, síntesis, M, mitosis; G0, G1, G2: "Gap" 0, 1 y 2.

Figura 21: Proliferación en ausencia de factores de crecimiento

Figura 22: La sobreexpresión de RAC3 induce la expresión de CiclinaE

Figura 23: La sobreexpresión de RAC3 aumenta los niveles de CD44

Figura 24: Localización subcelular de CD44

Figura 25: Niveles de mRNA RAC3 *in side population* CD133

Figura 25: Niveles de mRNA RAC3 en *side population* CD133

Figura 26: Ensayo de exclusión de Hoechst 42333

Figura 27: Niveles de RAC3 y ABCG2 en distintas líneas celulares

Figura 28: La sobreexpresión de RAC3 aumenta la capacidad clonogénica

Figura 29: La sobreexpresión de RAC3 aumenta la capacidad de formar tumor-esferas en suspensión

Figura 30: La sobreexpresión de RAC3 favorece la formación de esferoides compactos

Figura 31: Adhesión dependiente de E-Caderona

Figura 32: La sobreexpresión de RAC3 aumenta la capacidad de adhesión

Figura 33: Actividad NF- κ B en esferoides.

Figura 34: La sobreexpresión de RAC3 induce la expresión de un fenotipo mesenquimático:

Figura 35: La sobreexpresión de RAC3 induce cambios en el citoesqueleto

Figura 36: La sobreexpresión de RAC3 induce un fenotipo mesenquimático

Figura 37: La sobreexpresión de RAC3 induce deslocalización de β -Catenina a nivel de membrana plasmática

Figura 38: La sobreexpresión de RAC3 aumenta la capacidad migratoria

Figura 39: La sobreexpresión de RAC3 es necesaria para la migración

Figura 40: La sobreexpresión de RAC3 induce la actividad de MMP2

Figura 41: La sobreexpresión de RAC3 aumenta la capacidad invasiva

Figura 42: Determinación de la dosis óptima de H₂O₂ y Rapamicina

Figura 43: Las dosis de H₂O₂ y Rapamicina no generan apoptosis

Figura 44: Las dosis de H₂O₂ y Rapamicina generan senescencia en la línea HEK293.

Figura 45: La dosis H₂O₂ 150 μ M y Rapamicina 50 nM producen el arresto en fase G1 del ciclo celular.

Figura 46: La sobreexpresión de RAC3 Inhibe la senescencia prematura

Figura 47: La expresión de p21 inducida por senescencia prematura es bloqueada por la sobreexpresión de RAC

Figura 48: La sobreexpresión de RAC3 Inhibe la translocación de p16 y p21 a núcleo.

Figura 49: La sobreexpresión de RAC3 inhibe la translocación de p53 bajo estímulo genotóxico.

Figura 50: La sobreexpresión de RAC3 inhibe la translocación de p53 bajo estímulo genotóxico.

Figura 51: El silenciamiento de RAC3 tras sucesivos psajes genera senescencia en células HeLa.

Figura 53: RAC3 es necesario para la actividad telomerasa en células tumorales

Figura 54: La sobreexpresión de RAC3 induce tumores *in vivo*

Figura 55: TNF potencia la TEM inducida por sobreexpresión de RAC3

Figura 56: TNF potencia la expresión de SNAIL inducida por sobreexpresión de RAC3

Figura 57: TNF potencia la TEM inducida por sobreexpresión de RAC3

Figura 58: El TNF potencia los efectos observados por sobreexpresión de RAC3

Figura 59: RAC3 es necesario para la expresión de Vimentina inducida por TNF

Figura 60: TNF potencia la migración inducida por sobreexpresión de RAC3

Figura 61: La sobreexpresión de RAC3 es necesaria para inducir migración

Figura 62: TNF induce la expresión de MMP2

Figura 63: TNF induce la actividad de MMP2 y 9.

Figura 64: Expresión de β -Catenina

Figura 65: La sobreexpresión de RAC3 aumenta la translocación de β -Catenina a núcleo.

Figura 66: La sobreexpresión de RAC3 es necesaria para la translocación de β -Catenina a núcleo

Figura 67: La sobreexpresión de RAC3 aumenta la translocación de β -Catenina a núcleo en la línea HEK293.

Figura 68: La sobreexpresión de RAC3 aumenta la translocación de β -Catenina a núcleo. En la línea T47D.

Figura 69: La sobreexpresión de RAC3 aumenta la actividad transcripcional de β -Catenina.

Figura 70: RAC3 es necesario para que TNF induzca la expresión de CD44

Figura 71: RAC3 en la génesis tumoral

Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico	mTOR	kinasa TOR blanco de Rapamicina
AIB1	Amplificada en cáncer de mama 1	mTORC1,2	Complejos mTOR
AIF	Factor inductor de apoptosis 1	NCOA,1,2,3	Nuclear Receptor coactivator
AKT	Serina / treonina kinasa o PKB	NCOA3	Gene del coactivador de receptores nucleares 3
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico	NLS	Señal de exportación nuclear
AP-1	Proteína activadora 1	NF- κ B	Nuclear factor kappa
AR	Receptor de andrógenos	nM	Nanomolar
ARN	Ácido Ribonucleico	NR	Receptores nucleares
ARNm	ARN mensajero	OVX	Ovariectomizado
β -Gal	β -galactosidasa	p/CIP	Proteína asociada y cointegrada a p300/CBP
Bak	Proteína pro-apoptótica	P38	p38 kinasa
Bax	Proteína pro-apoptótica	PAGE	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida
Bcl	Flia. de proteínas que regulan de la permeabilidad mitocondrial y la vía intrínseca de la apoptosis / Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)	PAS	Per/ARNT/Sim
bHLH	Básico de hélice-vuelta-hélice	pb	Pares de base
bHLH-PAS	bHLH / dominios homólogos a Per/ARNT/Sim	PBS	Solución Salina de <i>Buffer</i> Fosfato
BIM	Proteína pro-apoptótica	p/CAF	p300/CBP-associated factor
CD1	Ciclina D1	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Cdk	Kinasa dependiente de Ciclina	PI3K	Fosfatidil-Inositol-3 kinasa
CMV	Citomegalovirus	PKA	Proteína kinasa A

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El cáncer

La expresión “neoplasia” se refiere a un crecimiento descontrolado de células que conlleva a la formación de una masa de tejido anormal. De tal manera, el término “cáncer” hace referencia específicamente a una neoplasia maligna constituida por células agresivas, con capacidad de extenderse a otros sitios del organismo. En contraste, una neoplasia benigna se limita a su tejido de origen y, por lo general, la enfermedad no compromete la vida del paciente. Si bien no todos los tumores evolucionan hacia la variante maligna, las neoplasias malignas siempre atraviesan un período inicial de benignidad, de duración variable, antes de hacerse agresivas. De este modo la tumorigénesis o transformación tumoral, es un proceso complejo que implica múltiples pasos. Cada uno de estos pasos refleja alteraciones genéticas que conllevan a la transformación progresiva de células normales a células tumorales. Las células cancerosas presentan capacidad proliferativa sostenida, insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa ilimitada, capacidad de inducir angiogénesis y de activar la invasión y metástasis. A estas características esenciales se agrega la inestabilidad genómica que presentan estas células, el microambiente que favorece la progresión maligna: entorno inflamatorio y presencia de células que cooperan con el fenotipo transformado, la capacidad de las células tumorales de reprogramar el metabolismo celular y de evadir la respuesta inmune del organismo. Si bien estas características se encuentran presentes en la mayoría de los tipos tumorales, no son aplicables a todos ellos.

En términos generales, la transformación tumoral involucra la activación e inhibición de múltiples vías de transducción de señal. Esta desregulación implica la mutación o sobreexpresión de genes involucrados en regular el correcto balance entre la proliferación, arresto celular, apoptosis y diferenciación (January et al, 2008). Cambios genéticos y epigenéticos pueden ocurrir en algunos niveles desde la pérdida o ganancia de cromosomas enteros a la mutación de un simple nucleótido de DNA, silenciar o activar un microRNA que controla la expresión de 100 a 500 genes (Balaguer et al., 2010; Lim et al., 2005) y cambios en patrones de metilación del genoma.

Existen 2 categorías de genes que son afectados por esos cambios: Los oncogenes que pueden ser genes normales que en condiciones patológicas son expresados en altos niveles o genes que sufrieron una alteración y por lo tanto

adquirieron una nueva propiedad. Por otro lado se encuentran los genes supresores tumorales que se encargan de inhibir la división celular, supervivencia u otras características de células tumorales. Mutaciones o desregulación de rutas que regulan su actividad, están frecuentemente asociados a la tumorigénesis (Wood and Jewett, 2007), (Knudson, 2001)

Sea cual fuere la condición fisiológica o genética que conduce a la transformación tumoral, como mencionamos anteriormente, para que un oncogén o gen supresor tumoral pueda iniciar la transformación tumoral debe ser capaz de conferir a las células las siguientes propiedades: 1) Mantenimiento de señales proliferativas, 2) Resistencia a la apoptosis y evasión de supresores de crecimiento 3) Adquisición de inmortalidad replicativa. 3) Adquisición de motilidad para el proceso metastásico. 4) Inducción de angiogénesis. 5) Inestabilidad genética. 6) Relación con el microambiente inflamatorio circundante.(Hanahan and Weinberg, 2011)

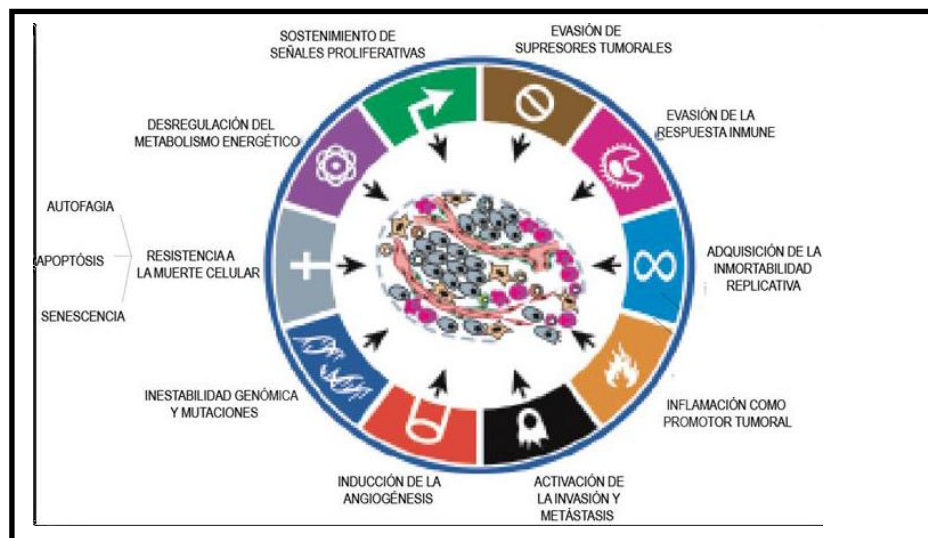


Figura 1: Requerimientos para la generación de una neoplasia. Adaptado de Hallmarck of Cancer, Hanahan and Weinberg, 2011.

1.1) **A- Mantenimiento de las señales proliferativas**

Las células cancerígenas pueden adquirir una alta capacidad proliferativa a través de diferentes vías. Una posibilidad consiste en la producción de factores de crecimiento mitogénicos por la propia célula tumoral que estimula de forma autócrina o parácrina su proliferación (Heldin, 2012). Alternativamente, las interacciones de las células cancerosas con las células del estroma tumoral, pueden suministrar factores de crecimiento (Aharinejad et al., 2009a; Aharinejad et al., 2009b). Otro mecanismo

consiste en el aumento de los niveles de expresión de receptores haciéndolas más sensibles a los factores de crecimiento o por hiperactivación de receptores de manera ligando-independiente.

Tabla1: Principales oncogenes expresados en células tumorales

Categoría	Mediadores/ Señales	Tipo de cáncer asociado	Función
Factores de crecimiento o nitrógenos	c-sis	glioblastomas, fibrosarcomas, osteosarcomas, cáncer de mama y melanomas	Induce proliferación celular
Recptores tirosina quinasa	EGFR, PDGFR, VEGFR, HER2/Neu	Cáncer de mama, gástricos, pulmón, páncreas	Transduce señales para el crecimiento y diferenciación celular
Tirosina quinasa citoplasmática	Src, BTK, ABL	Cáncer de colon, mama, melanoma, ovario, gástrico, cabeza y cuello, páncreas, pulmón, cerebro y hematopoyéticos	Median la respuesta y la activación de receptores que participan en la proliferación, migración y supervivencia
Serina/Treonina quinasa citoplasmáticas	RAF y quinasas dependientes de ciclinas	Cáncer de tiroides, colon, ovario y melanoma	Involucradas en el desarrollo, regulación del ciclo celular, proliferación.
GTPasas regulatorias	RAS	Cáncer de páncreas, colon, tiroides, melanoma y leucemias	Involucrada en proliferación)
Factores de transcripción	c-Myc, TCF, NF-κB	Linfomas, leucemias, cáncer de mama, páncreas, pulmón y retinoblastoma.	Regulan la transcripción de genes que regulan la proliferación y supervivencia.

Este mantenimiento de la señalización proliferativa también puede ser causado por la expresión constitutiva de los componentes de las cascadas de transducción de señal que operan río debajo de receptores, obviando de este modo el requerimiento de la unión del ligando a su receptor para iniciar la división celular (Hanahan and Weinberg, 2011).

1.1) B- Evasión de los mecanismos supresores del crecimiento

El fracaso en la inhibición del crecimiento es una de las alteraciones en el proceso de carcinogénesis. Mientras que los oncogenes dirigen la proliferación de las células, los productos de los genes supresores tumorales aplican frenos a la proliferación.

El ciclo celular consta de cuatro fases G1, S, G2 y M. Durante el “Gap” G1, la célula se prepara para la replicación del ADN (Harper et al., 1993), mientras que la propia replicación del ADN se produce en la fase de síntesis (S). Luego el ciclo se interrumpe en un segundo “Gap” (G2), donde se verifica la integridad del ADN replicado y si es necesario se repara. Los cromosomas replicados se separan durante la fase de mitosis (M), del que surgen dos células hijas que a su vez pueden reingresar en el ciclo celular. Las células quiescentes que ya no se dividen entran en la fase G₀.

La transición entre las diferentes fases del ciclo celular está orquestada por numerosas proteínas, dentro de éstas las quinasas dependientes de Ciclinas (Cdk) son muy importantes. La actividad de las Cdk es regulada por varios mecanismos como su asociación específica con distintas Ciclinas formando el complejo Ciclina-Cdk o su fosforilación en residuos específicos. La inhibición de su unión con las Ciclinas es efectuado por la familia de INK4 (Wu et al., 1995) (inhibidor de Cdk4) que inhibe específicamente a Cdk4 y Cdk6 y evita la transición G1/S o la familia de inhibidores Cip/Kip de Cdk compuesta por p21cip-1, p27kip-1, y p57Kip-2. Tanto p21cip-1 y p27Kip-1 son potentes inhibidores de Ciclina D y Ciclina E (Canepa et al., 2007).

Para su desarrollo las células tumorales también deben eludir los programas que regulan negativamente la proliferación celular que en su mayoría dependen de los genes supresores de tumor. En este sentido, el supresor tumoral p53 y el retinoblastoma (Rb) son cruciales en la progresión del ciclo celular. La proteína RB integra señales de diversas fuentes extra e intracelulares, e impide la transición G1/S inhibiendo la actividad de E2F que regula la expresión de genes requeridos para la fase S. De esta manera la hiperfosforilación de Rb por ejemplo por el complejo Ciclina/Cdk libera a Rb y deja libre a E2F, permitiendo que la célula entre en fase S (Bertoli et al., 2013) G1/S y G2 del ciclo celular. En la fase G1/S, p53 aumenta la transcripción del regulador negativo de Ciclina E/Cdk2 y Ciclina

D/Cdk4-6 p21cip-1. La detención en G2 por p53 puede implicar a p21cip-1 y a la proteína 14-3-3 (Vogelstein et al., 2000) tal como se observa en la figura 2.

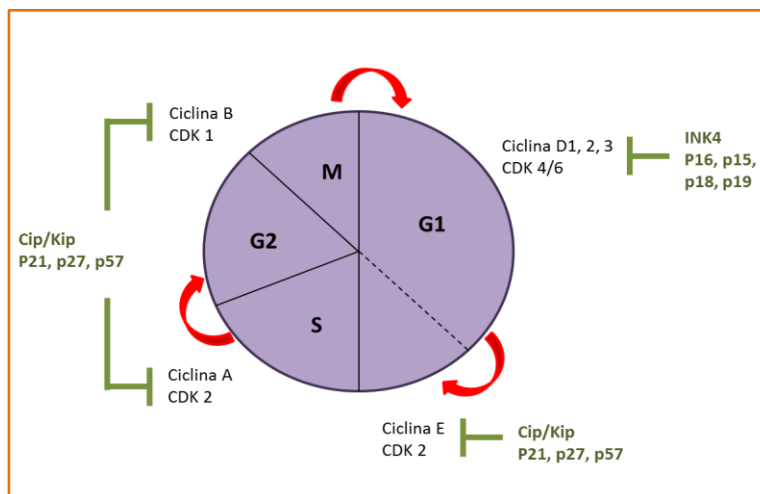


Figura 2: Fases del ciclo celular y sus reguladores

Por otro lado, p53 recibe señales de sensores de estrés dentro de los sistemas operativos intracelulares (daño genómico, baja disponibilidad de nucleótidos, o reservas como glucosa, o de oxígeno sub-óptimas) y funciona como un regulador negativo de la proliferación del ciclo celular.

Los estudios moleculares han identificado, una gran variedad de genes supresores tumorales involucrados en el cáncer humano (Levine, 1990; Levine, 1993). Ellos codifican para una serie de proteínas localizadas en distintos compartimientos celulares, siendo los más caracterizados la proteína p53 y retinoblastoma (RB) (Levine and Momand, 1990). Las mutaciones puntuales o deleciones en los genes que codifican las proteínas supresoras de tumor, frecuentemente conducen a la pérdida de su función (Levine, 1990).

El gen RB produce un regulador transcripcional que integra las señales provenientes de diversas fuentes extracelulares e intracelulares y en respuesta a ello decide si una célula debe continuar a través de su ciclo de crecimiento y división, tal como se esquematiza en la Figura 2 (Burkhart and Sage, 2008). El factor de transcripción TP53 es conocido como el guardián del genoma y se ha observado que el gen TP53 se encuentra mutado en más del 50% de los cánceres (Boominathan, 2010; Symonds et al., 1994).

Estas proteínas responden a diferentes señales intracelulares derivadas del estrés celular o daño en el DNA, deteniendo la progresión del ciclo celular y activando sistemas de reparación hasta que el DNA haya sido reparado e incluso

desencadenando la muerte celular por apoptosis, autofagia o activar programas de senescencia (Hanahan and Weinberg, 2011).

Tabla 2: Principales genes supresores tumorales mutados en cáncer

APC	Cancer de colon	Degradación de β -Catenina
BRACA1 y 2	Cancer de mama	Repara roturas de DNA doble cadena
P53	Distintos tipos	Supresor de ciclo celular
NF1	Neurofibromas	Regulador de la ruta de señalización Ras
PTEN	Gliomas, cáncer de colon	Inhibidor de PI3K, regula la ruta PI3K/AKT
Rb	Retinoblastoma	
VHL	Riñón y otros tipos	Degradación de HIF1a

1.1) **C- Inmortalidad y senescencia**

Todas las células maduras diferenciadas de todos los organismos solo sobreviven un determinado número de ciclos. Esto es lo que se conoce como límite de Hayflick, descrito hace más de 40 años, cuando se demostró que cultivos primarios de células no podían mantenerse en cultivo a perpetuidad (Shay and Wright, 2000).
Figura 3.

La capacidad de replicación celular esta mediada por los telómeros, las células normales del cuerpo y las células no inmortalizadas en cultivo, sufren un acortamiento telomérico luego de cada ciclo de replicación, cuando la longitud del telómero llega a un máximo, se da lugar a la detención irreversible del crecimiento, en un proceso conocido como senescencia celular.

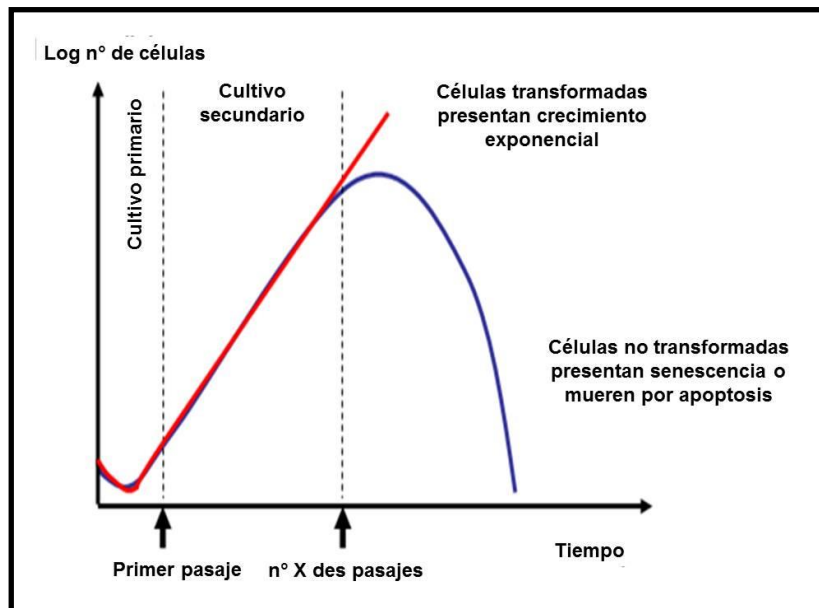


Figura 3: Límite de Hayflick. Los cultivos primarios de células presentan un número x de pasajes, luego entran en crisis debido al acortamiento telomérico lo cual conduce a la muerte celular (línea azul). Las células transformadas presentan un crecimiento exponencial en indeterminado número de pasajes.

En algunos casos, la enzima telomerasa mantiene la longitud de los telómeros. La unidad catalítica de la telomerasa TERT junto con la subunidad TERC, sintetizan la repetición telomérica en el final del cromosoma el cual debido a la replicación asimétrica del ADN se pierde progresivamente en cada ronda de replicación (Smogorzewska and de Lange, 2004). La mayoría de las células somáticas no contienen suficiente TERT para mantener el largo de los telómeros (Masutomi et al., 2003), lo que resulta en el acortamiento del telómero en cada ronda de división celular. La expresión exógena de telomerasa puede incrementar o estabilizar la longitud del telómero en células somáticas resultando en su inmortalización (Masutomi and Hahn, 2003).

De este modo, las únicas células del cuerpo con inmortalidad replicativa son las células madre y las células tumorales, las cuales mantienen la longitud de sus telómeros por activación constitutiva de la enzima telomerasa o por mecanismos telomerasa independientes.

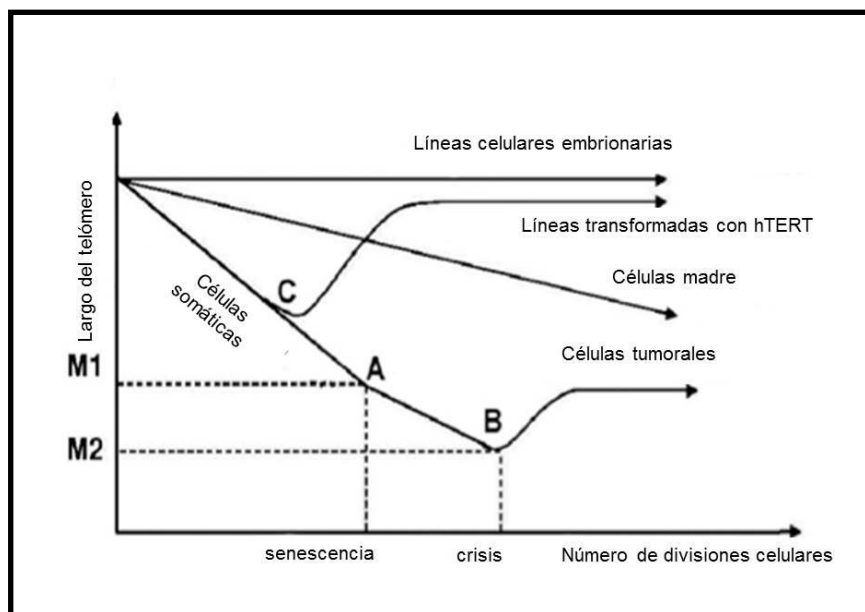


Figura 4: Longitud de telómero vs número de divisiones celulares. Adaptado de. **The regulation of telomerase in oncogenesis.** (Skvortzov et al., 2009) Las células madre embrionarias mantienen la longitud de los telómeros a lo largo de sucesivas divisiones. Las células madre, van perdiendo la capacidad ilimitada de replicación. En las células somáticas luego de un determinado número de pasajes se produce el acortamiento telomérico y la entrada en senescencia (A) las células que siguen dividiendo entran en crisis y mueren por apoptosis (B) y las que aun consiguen sobrevivir sufren una transformación tumoral. Las células somáticas inmortalizadas con hTERT muestran una elongación de los telómeros y una capacidad ilimitada de replicación (C).

El acortamiento telomérico, conduce a una respuesta de daño al DNA, activando la ruta de p53 lo que resulta en un arresto del ciclo celular (Skvortzov et al., 2009). El acortamiento telomérico también puede disparar respuestas de daño al DNA mediados por la ruta ATM/ATR-p53-p21 (Herbig et al., 2004). Entonces, si la senescencia celular inducida por un acortamiento telomérico es una respuesta al daño al ADN, los agentes químicos que dañan al ADN pueden inducir senescencia. De este modo, se ha reportado que los agentes que dañan el DNA como por ejemplo el estrés oxidativo u otros tipos de estrés celular como el estrés metabólico por insuficiencia de nutrientes o de oxígeno, pueden inducir un fenotipo senescente sin que se produzca acortamiento telomérico, fenómeno que se conoce como senescencia prematura (Ben-Porath and Weinberg, 2004; Ben-Porath and Weinberg, 2005). Incluso señales oncogénicas o mitogénicas descontroladas, tales como H-RAS, también pueden inducir senescencia (Collado and Serrano, 2010; Dimri, 2005) (Figura 5).

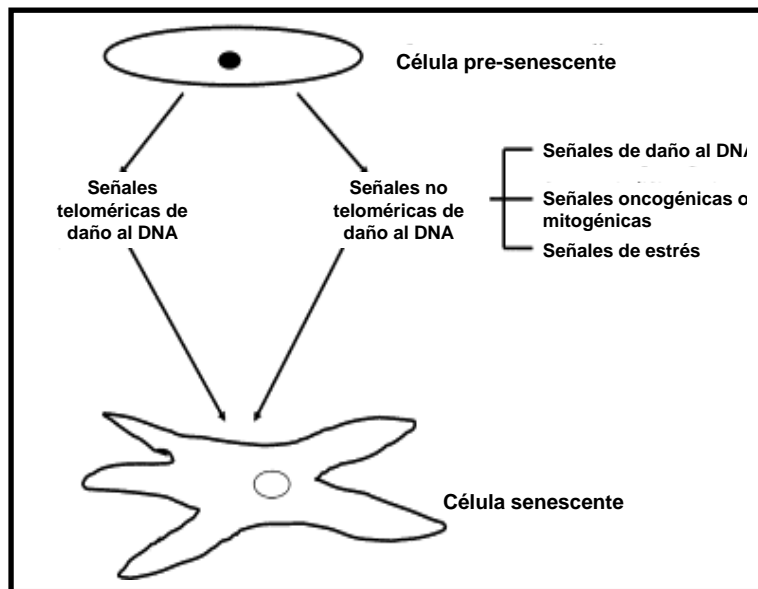


Figura 5: La senescencia puede producirse por acortamiento telomérico o por distintas señales no teloméricas, como daño al DNA, señales de estrés, y señales oncogénicas. En todos los casos se activan sistemas de respuesta de daño al DNA que conducen al arresto del ciclo celular y la entrada en senescencia.

En células humanas, las señales teloméricas principalmente activan la ruta p53-p21 pRB mientras que las señales no teloméricas activan la ruta p53-p21-pRB y la ruta p16-pRB (Dimri, 2005).

Dependiendo de la severidad del daño al genoma, p53 puede activar programas genéticos que pueden preservar la capacidad proliferativa de la célula, puede producir un arresto irreversible del ciclo celular conduciendo a la senescencia o puede inducir la apoptosis. Muchos estudios sugieren que la inducción de p21 por p53 inhibe la actividad CDK2/Ciclina E y la actividad de CDK4/Ciclina lo cual resulta en la hipofosforilación de RB quien media el arresto del ciclo celular durante la senescencia (Itahana et al., 2004).

La senescencia, es considerado como un proceso anti-tumoral, dado que impide la expansión clonal o proliferación de células conteniendo mutaciones o errores genómicos importantes (Campisi, 2005). Este proceso, impide la propagación de errores y aberraciones genómicas a través de un arresto irreversible del ciclo celular (Campisi, 2005; Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Chen et al., 2007).

Es ampliamente aceptado que las células cancerosas requieren un potencial de replicación ilimitado a fin de ser capaces de generar nuevos tumores macroscópicos (Hanahan and Weinberg, 2011).

Más del 80% de los tumores presentan una reactivación de los mecanismos para mantener la longitud de los telómeros, mediante la sobreexpresión de la enzima telomerasa, lo que da lugar a células telomerasa positivas que mantienen una longitud

estable en el largo de los telómeros lo que conduce a la inmortalización de células tumorales (Diotti and Loayza, 2011).

A pesar de su rol anti-tumoral, la senescencia también puede tener un rol dual en el desarrollo tumoral. Es sabido que en el arresto irreversible del ciclo celular, si bien la célula no se divide y es incapaz de dejar progenie, también cambia su patrón de expresión génica y comienza a producir varios factores de crecimiento y citoquinas (Campisi, 2013; Campisi et al., 2011; Davalos et al., 2010; Tchkonja et al., 2013; Velarde et al., 2013). De acuerdo con estos cambios en el patrón de expresión génica por parte de las células senescentes, se ha postulado que los factores liberados por las mismas podrían contribuir al desarrollo tumoral de modo parácrino, favoreciendo la proliferación de células portadoras de mutaciones que no han entrado en senescencia (Davalos et al., 2010; Falandry et al., 2014). De aquí el rol dual de la senescencia en el desarrollo tumoral.

Durante la senescencia, se produce un verdadero cambio de la arquitectura nuclear (Dimauro and David, 2009; Zink et al., 2004). Estos cambios pueden ser detectados, en cultivos de células y muestras de tejido por técnicas de tinción específicas, a través de la formación de focos heterocromáticos y núcleos grandes (Dimauro and David, 2009; Fernandez Larrosa, 2015; Zink et al., 2004)

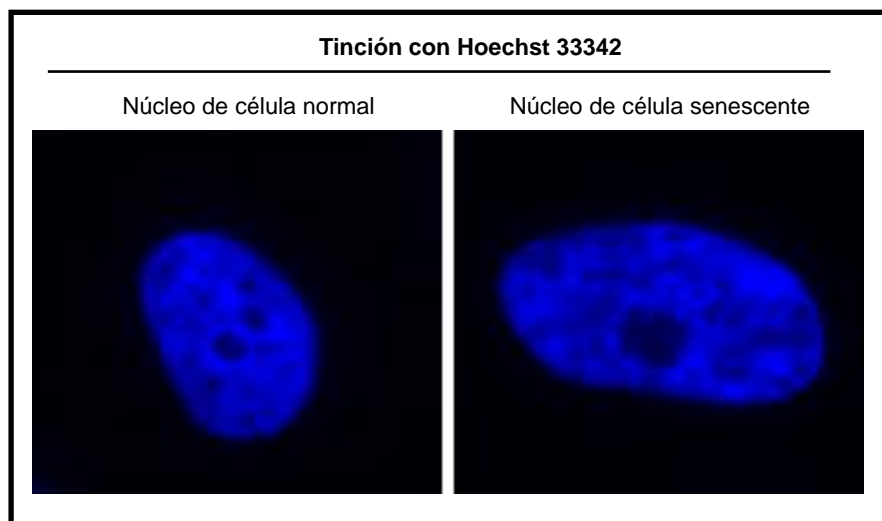


Figura 6: Tinción con Hoechst células Wi38, proliferando o en células con senescencia replicativa. Adaptado de "Immunosenescence and Senescence Immunosurveillance" (Augert and Bernard, 2013)

También pueden detectarse proteínas asociadas a estos focos así como la sobreexpresión de proteínas supresoras de ciclo como p21 o p53. Un rasgo característico de las células senescentes es la producción de la enzima β -

Glalactosidasa ácida asociada a células senescentes (SA:βGAL ácida) que es detectado por un ensayo colorimétrico usando como sustrato X-Gal a pH:6 (Debacq-Chainiaux et al., 2009; Fernandez Larrosa et al., 2015; Liu et al., 2011; Zhang et al., 2013)

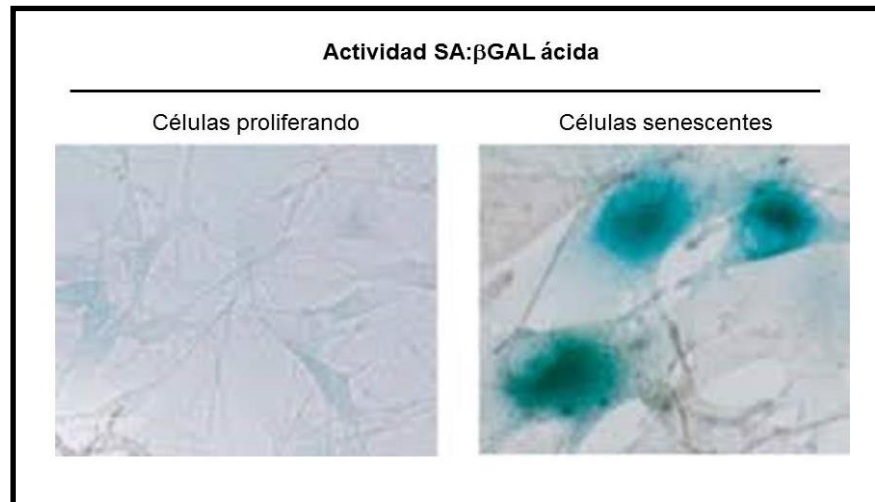


Figura 7: Actividad SA:βGAL ácida en células Wi38, proliferando o en células con senescencia replicativa. Adaptado de “Immunosenescence and Senescence Immunosurveillance” (Augert and Bernard, 2013)

Como mencionamos al comienzo, las únicas células del organismo capaces de replicar indefinidamente son las células madre embrionarias. Por tal motivo, en el transcurso de la vida, es de esperar que se produzca un acortamiento telomérico en células diferenciadas así como el acúmulo de mutaciones, y la vejez sería acompañada por un aumento en el contenido de células senescentes (Collado et al., 2007). De este modo la senescencia preservaría al organismo del desarrollo de tumores. Sin embargo, al igual que en el proceso apoptótico, si fallan los mecanismos celulares que conducen a la entrada en senescencia ya sea prematura o replicativa, debido a distintos tipos de estrés o por la propia vejez, la inestabilidad genómica aumenta y con ello el acúmulo de mutaciones lo cual puede conducir a la transformación tumoral (Nardella et al., 2011). Más aun, la presencia de células senescentes en el microambiente próximo a células con potencial tumorigénico, podría contribuir a su expansión a través de la liberación de citoquinas y factores de crecimiento, que favorecen la proliferación de células tumorales (Kuilman et al., 2010), y esto sería compatible con lo observado en individuos maduros quienes presentan mayor probabilidad de desarrollar distintos tipos de tumor (Collado et al., 2007).

1.1) D- Resistencia a la muerte celular: apoptosis, autofagia o necrosis

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso finamente regulado que involucra cambios morfológicos característicos como encogimiento celular, fragmentación del ADN y formación de cuerpos apoptóticos, que finalmente son fagocitados sin que se desate una respuesta inflamatoria.

La maquinaria apoptótica se compone de dos reguladores río arriba que a su vez se dividen en dos circuitos principales: uno de recepción y procesamiento de señales extracelulares o programa extrínseco, que implica al ligando del receptor Fas/Fas, y otro de detección e integración de señales de origen intracelular o programa intrínseco. Los componentes efectores río abajo culminan en la activación de una proteasa normalmente latente (Caspasas 8 y 9, respectivamente), que inicia una cascada de señalización que implica la proteólisis de las Caspasas efectoras de la fase de ejecución de la apoptosis

El programa de apoptosis intrínseca es controlado por los miembros pro- y anti-apoptóticos de la familia de proteínas reguladoras Bcl-2. Bcl-2, junto con Bcl-XL, Bcl-w, MCL-1 y A1 son inhibidores de la apoptosis, en gran parte uniéndose y suprimiendo la activación de dos proteínas pro-apoptóticas: Bax y Bak (en la membrana externa mitocondrial). De esta manera si Bax y Bak son liberadas interrumpen la integridad de la membrana mitocondrial externa, liberando proteínas de señalización pro-apoptóticas, como citocromo c y activando una cascada de Caspasas responsables de los múltiples cambios celulares asociados con la apoptosis. Bax y Bak comparten con Bcl-2 dominios de interacción proteína-proteína, que median sus diversas interacciones físicas denominados BH3. Las actividades de esta subfamilia de proteínas relacionadas por contener un único motivo BH3 están acopladas a una variedad de sensores celulares, de este modo las proteínas “BH3-only” interfieren con los miembros anti-apoptóticos como Bcl-2 o directamente estimulan a miembros pro-apoptóticos de esta familia (Ouyang et al., 2012).

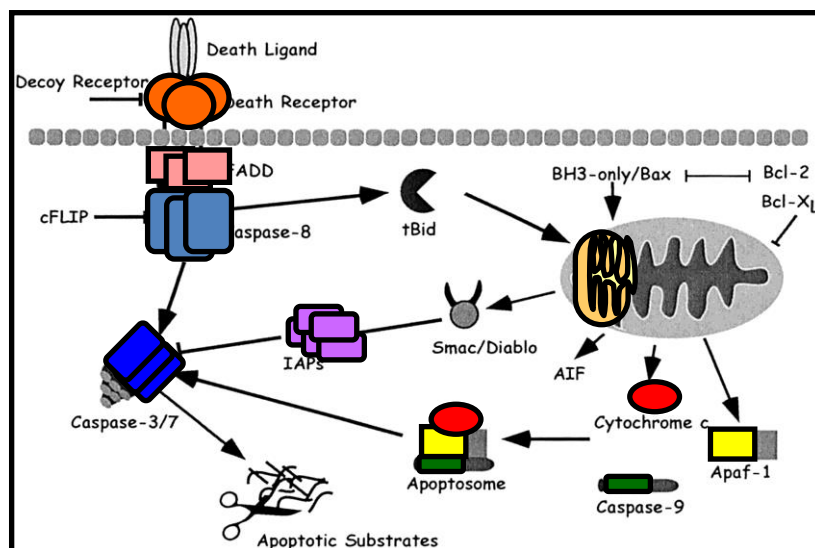


Figura 8: Vías apoptóticas intrínseca y extrínseca.

Es sabido que la apoptosis actúa como una barrera natural para el desarrollo tumoral (Ouyang et al., 2012), sin embargo algunos tumores escapan o disminuyen la apoptosis avanzando a estados de alto grado de malignidad y resisten las terapias antitumorales (Holohan et al., 2013). El más común es la pérdida de función de p53 o RB, pero también lo logran aumentando la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 o mediante la regulación negativa de factores pro-apoptóticos como Bax, Bim y Puma o interrumpiendo la vía extrínseca inducida por ligando (Adams and Cory, 2007a; Adams and Cory, 2007b). Las células tumorales deben por lo tanto desarrollar mecanismos por los cuales puedan evadir la inducción de apoptosis por las vías antes mencionadas.

Además de la apoptosis existen otros mecanismos de muerte celular entre los que se incluyen la autofagia y la necrosis (Jin and El-Deiry, 2005; Ouyang et al., 2012).

La autofagia es un proceso celular altamente regulado que permite a las células descomponerse en orgánulos celulares, como ribosomas y mitocondrias, permitiendo que los catabolitos resultantes se reciclen en caso de ser necesario y sean reutilizados para la biosíntesis y el metabolismo energético. De esta manera las vesículas intracelulares o autofagosomas envuelven los orgánulos intracelulares y luego se fusionan con los lisosomas donde se produce la degradación que genera metabolitos de bajo peso molecular que sirven de soporte por ejemplo en la supervivencia en entornos limitados en nutrientes (Figura 9).

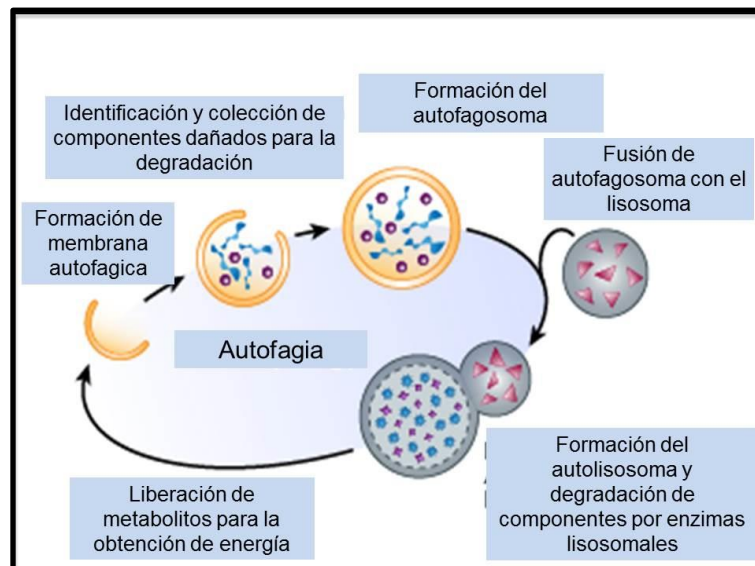


Figura 9: Proceso autofágico para la obtención de energía. Adaptado de (Mendez et al 2009).

Aunque la autofagia ocurre en niveles basales en todas las células, diversos factores como estrés celular, o daño mitocondrial o del retículo endoplasmático (Abbott et al., 2009) o bien la privación de nutrientes son fuertes inductores de esta maquinaria de degradación. En algunos casos, la autofagia también puede ser inducida por factores de transcripción como HIF1- α y FoxoA1, implicados en la respuesta a condiciones de hipoxia y el envejecimiento, respectivamente (Abbott et al., 2009).

Paradójicamente, la autofagia contribuye tanto a procesos normales como patológicos. En el desarrollo tumoral, cuando el tumor aumenta de tamaño y previo a la angiogénesis el mismo atraviesa una etapa de ayuno e hipoxia debido a la falta de irrigación sanguínea y precisamente, la autofagia es un proceso que permite la supervivencia celular hasta la generación de nuevos vasos sanguíneos que irrigen el foco tumoral (Kimmelman, 2011; Mathew et al., 2009a). Sin embargo, en otras etapas del proceso de desarrollo tumoral, cuando la autofagia ocurre de modo exacerbado, puede llevar a la muerte celular (Kimmelman, 2011; Mathew et al., 2009b). Se ha demostrado que células tumorales estresadas se convierten a un estado de latencia reversible a través de la autofagia (Peinado et al., 2011b) que les podría permitir la persistencia y el eventual rebrote de algunos tumores en estado tardío post-tratamiento con agentes antitumorales. Por lo tanto la autofagia puede tener un doble efecto en tumores, ya sea de inhibición durante las primeras etapas tumorales o de promoción en etapas posteriores o durante la quimioterapia permitiendo el

mantenimiento del tumor en estado latente (Kimmelman, ; Mathew et al., 2007; Peinado et al., 2011b)

Más aun, la inhibición de la autofagia en conjunto con la inhibición de la apoptosis en estadíos tempranos de la génesis tumoral, pueden conducir al aumento de la inestabilidad genómica lo que conduce a la activación de oncogenes y con ello la transformación y progresión tumoral (Eisenberg-Lerner et al., 2009; Mathew et al., 2007).

En la siguiente figura se resume la relación entre autofagia y apoptosis que pueden contribuir a la tumorigénesis y a la progresión tumoral

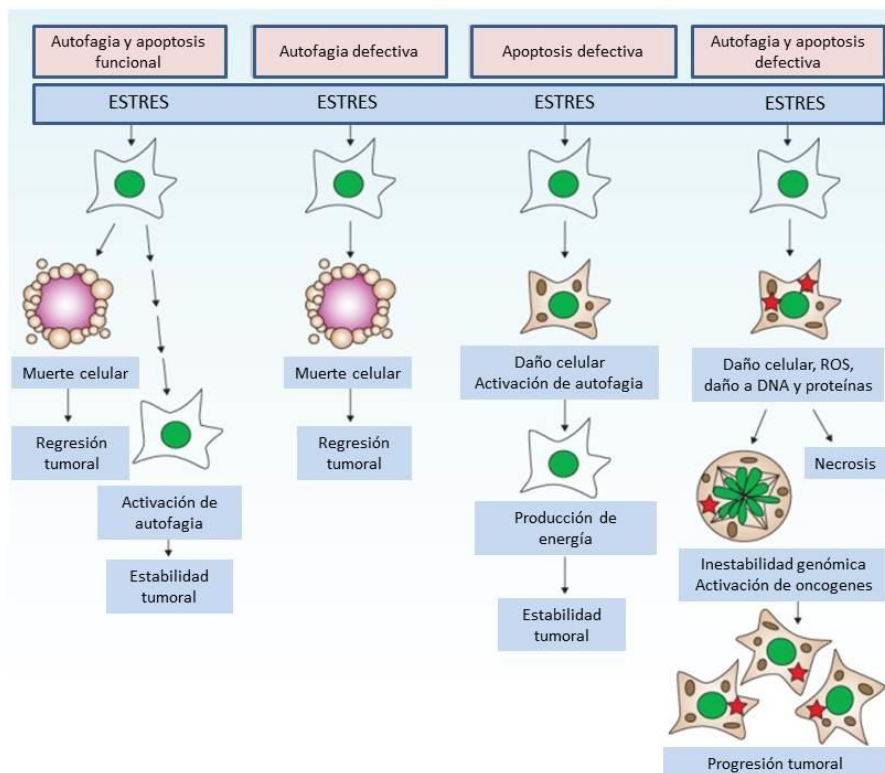


Figura 10: Relación entre apoptosis y autofagia en la tumorigénesis. Adaptado de (Yang et al, 2010) *Eaten alive: a history of macroautophagy*.

Se ha demostrado que existe un crosstalk entre las señales de regulación de la autofagia, la apoptosis y la homeostasis celular. Por ejemplo, la vía de señalización que involucra la PI3K y a las quinasas AKT y mTOR, es estimulada por señales de supervivencia bloqueando la apoptosis e inhibiendo la autofagia, análogamente cuando las señales de supervivencia son insuficientes, la vía de señalización de PI3K disminuye y de esta manera puede inducirse la autofagia o la apoptosis ^{De Bosscher, 2000 #175;Scheinman, 1995 #189;Heck, 1997 #312} La vía mTOR censa el estado energético, de oxígeno y

de aminoácidos de la célula para controlar muchos procesos substanciales, como la síntesis de proteínas, de lípidos y la autofagia.

La vía mTOR inhibe la autofagia a través de la fosforilación e inactivación de elementos que forman parte del complejo que inicia la autofagia (Furuyama et al., 2011; Kamada et al., 2000; Koren et al.).

La vía mTOR puede ser activada por factores de crecimiento a través de la activación de AKT (Hay, 2005) y citoquinas pro-inflamatorias como TNF a través de la activación de IKK (Lee et al., 2007). A su vez muchos factores de estrés inhiben a mTOR actuando por ejemplo en respuesta a condiciones de hipoxia o a un estado de baja energía (Horak et al., 2010). El daño en el ADN también inhibe a mTOR a través de mecanismos que requieren la transcripción dependiente de p53 (Benway et al., 2009; Budanov and Karin, 2008).

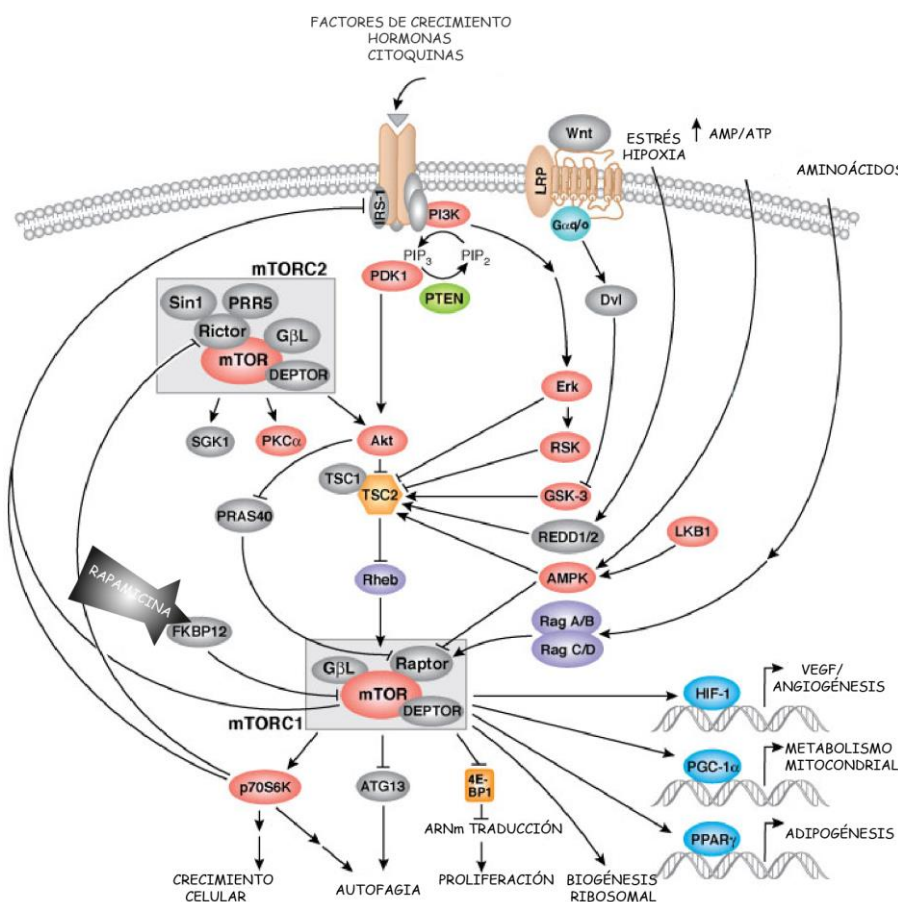


Figura 11: La vía mTOR y la multiplicidad de señales que censa, vías que activa e integra. Adaptado de <http://flipper.diff.org/app/pathways/595>.

La vía mTOR posee innumerables interconexiones con distintas vías de señalización relacionadas con el potencial tumorigénico de oncogenes y genes supresores tumorales y por lo tanto esta vía se encuentra frecuentemente

desregulada en numerosos tipos tumorales (Easton and Houghton, 2006). En particular la vía mTORC1 es inhibida por Rapamicina y análogos, que han mostrado tener acciones anti-tumorales (Amin et al., 2010; Benito et al., 2006).

Por otra parte, también se ha descrito otro tipo de muerte celular o necrosis donde las células se hinchan y estallan, liberando su contenido en el microambiente del tejido local. En este caso, si bien la liberación de señales pro-inflamatorias en el microambiente puede reclutar células inflamatorias para evaluar el grado de daño y eliminar los restos necróticos, también es cierto que la liberación de factores como IL-1, puede estimular a las células vecinas viables a proliferar (Vakkila and Lotze, 2004). En consecuencia, las neoplasias incipientes y tumores potencialmente invasivos y metastásicos pueden obtener una ventaja al tolerar cierto grado de muerte celular necrótica. En la actualidad se cree que la necrosis en algunas circunstancias está bajo control genético, en lugar de ser un proceso aleatorio y no dirigido como se creyó históricamente.

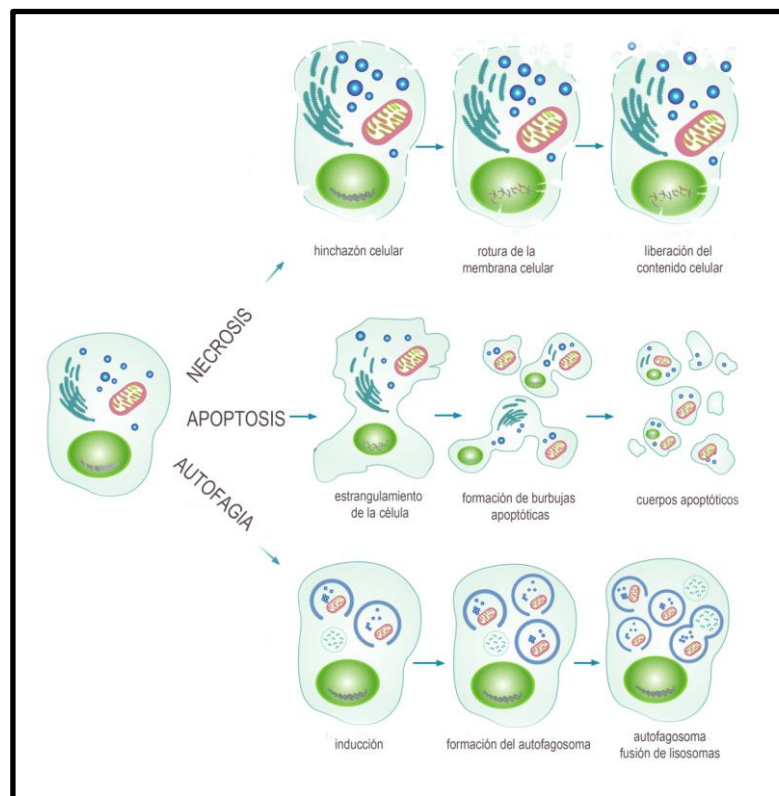


Figura 12: Principales diferencias entre las distintas formas de muerte celular. Adaptado de www.imgenex.com

1.1) E- Activación del proceso metastásico

A medida que las neoplasias avanzan en su grado patológico y de malignidad, las células cancerosas adquieren la capacidad de moverse desde el tumor primario a otros órganos, lo que se refleja en la invasión local y la metástasis (Hanahan and Weinberg, 2011). Este proceso puede ser subdividido en varios pasos, que son conocidos en conjunto como la cascada de invasión metástasis:

- 1) Vascularización y crecimiento progresivo del tumor primario
- 2) Invasión local a través de la matriz extracelular (ECM) y las capas de células del estroma circundante
- 3) La intravasación de las células tumorales al lumen de los vasos linfáticos y sanguíneos.
- 4) La supervivencia al transporte
- 5) La detención de estas células en órganos distantes.
- 6) La extravasación al parénquima de esos órganos.
- 7) La formación de micro-metástasis.
- 8) Crecimiento del tumor para formar macro-metástasis

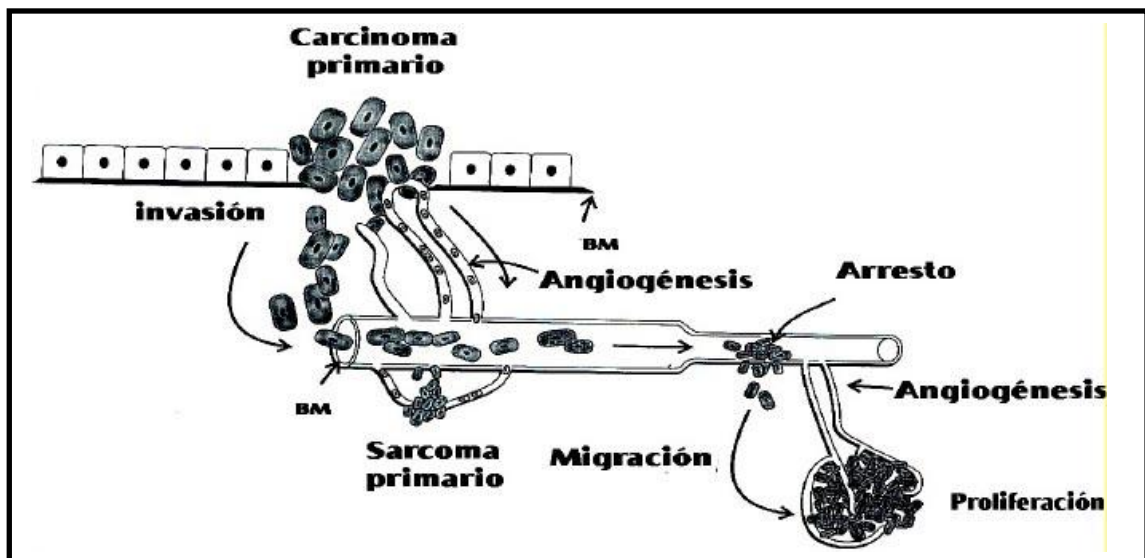


Figura 13: Cascada metastásica. Adaptado de "slideshare.net/basmedblog/12—βiologa-y-marcadores-tumorales".

La complejidad del proceso metastásico requiere entender cómo ocurren estos pasos. Para explicar este proceso se han evaluado una serie de características que las células deben adquirir en los primeros pasos de la cascada metastásica. El conjunto de estos pasos se han simplificado en el concepto de Transición Epitelio

Mesenquimática (TEM) que se podría definir como una reprogramación celular que confiere a las células neoplásicas epiteliales las características biológicas necesarias para acompañar los pasos necesarios en el proceso metastásico (Acloque et al., 2009; Singh and Settleman, 2010). La TEM primero fue descrita durante el desarrollo embrionario (Nieto, 2011; Shook and Keller, 2003) Específicamente la TEM genera tipos celulares mesenquimáticos desde precursores epiteliales y endoteliales y esa conversión es indispensable para que las células adquieran movilidad durante la embriogénesis, siendo una característica que comparten las células tumorales en el proceso metastásico (Acloque et al., 2009; Thiery, 2009; Thiery et al., 2009).

Existen una variedad de factores de transcripción que son usualmente expresados durante la TEM que causan un rearrreglo en el comportamiento celular y la organización tisular (Yilmaz and Christofori, 2010). Las células epiteliales se unen a células vecinas por uniones célula-célula, mediada por desmosomas y uniones adherentes (Yilmaz and Christofori, 2010). La mayoría de los factores de transcripción sobre-expresados en TEM involucran represores transcripcionales tales como SNAIL (Cano et al., 2000), Slug (Bolos et al., 2003) Twist (Yang et al., 2010) y Zeb1 (Eger et al., 2005) que reprimen la expresión de E-Cadherina.

La TEM, además, frecuentemente involucra la sobreexpresión de marcadores mesenquimales como N-Cadherina (proteína de unión célula-célula de la familia de las E-Cadherinas) (Maret et al., 2010), Vimentina (filamento intermedio) y componentes de la matriz extracelular como Fibronectina (McGrail et al., 2015). Estos cambios culminan en la polarización celular, la adquisición de movilidad y la secreción de enzimas proteolíticas que degradan la matriz extracelular (ECM) (Micalizzi et al., 2010) aumentando la capacidad de invadir tejidos circundantes (Acloque et al., 2009; Micalizzi et al., 2010; Thiery et al., 2009)

Por otro lado, existen evidencias que vinculan la interacción de las células tumorales y las células del estroma están implicadas en la adquisición de la capacidad invasiva (Krstic and Santibanez, 2014; Mao et al., 2013; Strong et al., 2015). De este modo, las características del microambiente tumoral pueden condicionar dicha capacidad. Así por ejemplo, se ha demostrado que la liberación de citoquinas y factores de crecimiento por los fibroblastos, macrófagos y células madre mesenquimales residentes en el tejido, actúan de forma parácrina sobre las células tumorales aumentando la capacidad metastásica (Dirat et al., 2011; Karnoub et al., 2007; Paulsson and Mücke, 2014)

Una vez que las células tumorales llegan a la circulación, desarrollan diversos mecanismos que les permiten sobrevivir al estrés que supone la separación de la ECM

(Tan et al., 2013; Vitale et al., 2014) y resistir al ataque de células del sistema inmune (Vitale et al., 2014). Existen evidencias que demuestran que una vez que las células tumorales entran en la circulación, se dispara la cascada de coagulación a través de la formación de trombos formados por células tumorales, fibrinógeno y plaquetas (Degen and Palumbo, 2012; Sharma et al., 2014). El fibrinógeno puede unir a las células tumorales a través de la unión con integrinas del tipo $\alpha V\beta 3$ en las células tumorales y a las plaquetas activadas a través de la integrina $\alpha IIb\beta 3$ (Buergey et al., 2012; Chen et al., 2011). La capacidad de formación del pequeño trombo, asegura la supervivencia de las células tumorales en el torrente sanguíneo ya que las células *natural killer* (NK) del sistema inmune no pueden reconocerlas cuando se encuentran asociadas a plaquetas y fibrinógeno (Buergey et al., 2012). Estudios in vitro revelan que la inhibición de la expresión de la integrina $\beta 3$ en células tumorales y plaquetas reduce la capacidad de unión a fibrinógeno y plaquetas (Palumbo et al., 2005), con aumento a la muerte celular inducida por NK (Degen and Palumbo, 2012), comprometiendo de este modo el proceso metastásico (Buergey et al., 2012).

Las células tumorales circulantes viajan por la circulación sanguínea o linfática hasta detenerse en órganos distantes, según se ha postulado, de manera organo-específica (Paterlini-Brechot, 2014; Pienta et al., 2013). Muchas evidencias sugieren que las células del tumor primario secretan factores y citoquinas tales como SDF-1, TNF, TGF- β y VEGF, que influyen en el reclutamiento de diferentes tipos celulares a los sitios premetastásicos, lo que conlleva al incremento de moléculas específicas que favorecen la formación del nicho premetastásico favoreciendo de este modo la metástasis (Peinado et al., 2011a; Sceneay et al., 2013; Sleeman, 2012).

Cuando las células tumorales se adhieren a los capilares, atraviesan la pared del vaso en un proceso llamado extravasación introduciéndose al parénquima del órgano diana y originando las micro-metastasis (Sosa et al., 2014; Talmadge, 2010). Una vez en el tejido diana, las células generalmente atraviesan un periodo de quiescencia denominado "*dormancy*" del cual pueden despertar muchos años después luego de establecida la micro-metástasis (Sosa et al., 2014; Ghajar, 2015). Una vez más, a medida que el tumor se va regenerando en el sitio metastásico, la disponibilidad de oxígeno y nutrientes fomenta el proceso angiogénico y se establece la macro-metastasis (Gao et al., 2008; Hanahan and Weinberg, 2011).

1.1) F- Inducción de la angiogénesis

Durante el inicio de la tumorigénesis se produce un crecimiento tumoral descontrolado que conlleva a la formación de una masa tumoral de comportamiento avascular, por lo cual en su crecimiento las células tumorales enfrentan periodos de escases de nutrientes y oxígeno. Para que el tumor pueda progresar es necesario que se genere una vasculatura asociada al tumor, generada por el proceso angiogénico, que proporcione los nutrientes y oxígeno necesarios para garantizar el crecimiento del tumor (Hanahan and Weinberg, 2011)

Algunos reguladores angiogénicos son proteínas de señalización que se unen a los receptores de membrana en las células endoteliales vasculares (Semenza, 2003). Un importante inductor de la angiogénesis es el factor de crecimiento endotelial vascular- α (VEGF- α) cuya expresión puede ser aumentada por condiciones de hipoxia y por señalización oncogénica (Bae et al., 2010; Ferrara et al., 2003; Gerber and Ferrara, 2003). En este sentido, el microambiente hipóxico juega un rol crítico en tumores. Los tumores sólidos, presentan comúnmente regiones de hipoxia en todo el tejido debido tanto a la vasculatura caótica, como al flujo de sangre irregular en las regiones necróticas. Los efectos de la hipoxia están mediados principalmente por factores de transcripción HIF compuestos por una subunidad alfa sensible a oxígeno (HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α) y una subunidad beta expresada constitutivamente (HIF- β , conocida como ARNT) (Semenza, 1999). HIF regula la expresión de genes implicados en el control del metabolismo anaeróbico, la angiogénesis, la proliferación celular, la apoptosis y la diferenciación (Minet et al., 2000; Semenza, 2003; Semenza, 2010b).

La cantidad de HIF- α , es regulada post-traduccionamente, degradándose rápidamente en condiciones de normoxia a través de la vía de ubiquitinación del proteosoma dependiente de von Hippel-Lindau, mientras que en condiciones de hipoxia se inhiben las prolin-hidroxilasas dependientes de O₂ (PHD) (Semenza, 2001) que degradan su dominio dependiente de O₂, estabilizando las subunidades α que se trasladan al núcleo y forman dímeros con HIF- β . Se ha demostrado que los niveles de HIF-1 también pueden incrementarse por genes supresores de tumor disfuncionales como p53, TSC2, PTEN (Protein/lipid phosphatase) y LKB1, entre otros; así como por proteínas de virus oncogénicos (Semenza, 2010a). Por otro lado la hipoxia tisular también es común durante la inflamación crónica debido al aumento de la actividad metabólica que interrumpe la perfusión en el sitio inflamado (Taylor, 2008).

Muchos estudios demostraron que la activación de HIF-1/2 por hipoxia en tumores es un mecanismo muy importante que conduce a una mayor agresividad del tumor, la metástasis y mortalidad (Maxwell, 2005). Entonces la activación de VEGF por

el factor de transcripción inducible por hipoxia HIF-1 es un mecanismo clave en la angiogénesis inducida por hipoxia y la metástasis (Bae et al., 2010; Forsythe et al., 1996; Liang et al., 2011)

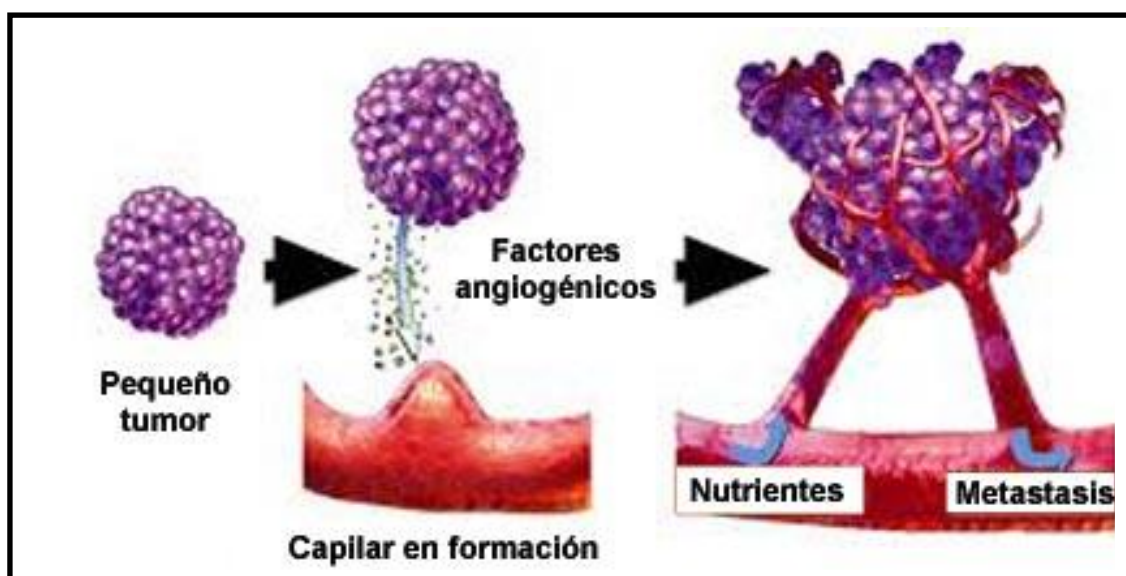


Figura 14: Inducción de la angiogénesis. Adaptado de Vascular targeting agents. Horizons in Cancer Therapeutics. (Sieman et al, 2002)

1.1) **G- Microambiente tumoral: la inflamación en la génesis y progresión tumoral**

Existen abundantes evidencias del efecto promotor tumoral que las células inmunes y la respuesta innata cumplen en la progresión neoplásica (Colotta et al., 2009; DeNardo et al., 2010; Grivennikov et al., 2010; Mantovani et al., 2008). Ya sea mediante el suministro de moléculas bioactivas para el microambiente tumoral, como factores de crecimiento, de supervivencia, pro-angiogénicos o enzimas modificadores de la matriz extracelular que facilitan la angiogénesis, invasión y metástasis, o bien señales inductivas que conducen a la activación del programa de TEM, entre otros (de Visser and Coussens, 2006; Grivennikov et al., 2010; Grivennikov and Karin, 2010; Qian and Pollard, 2010; van Kempen et al., 2006).

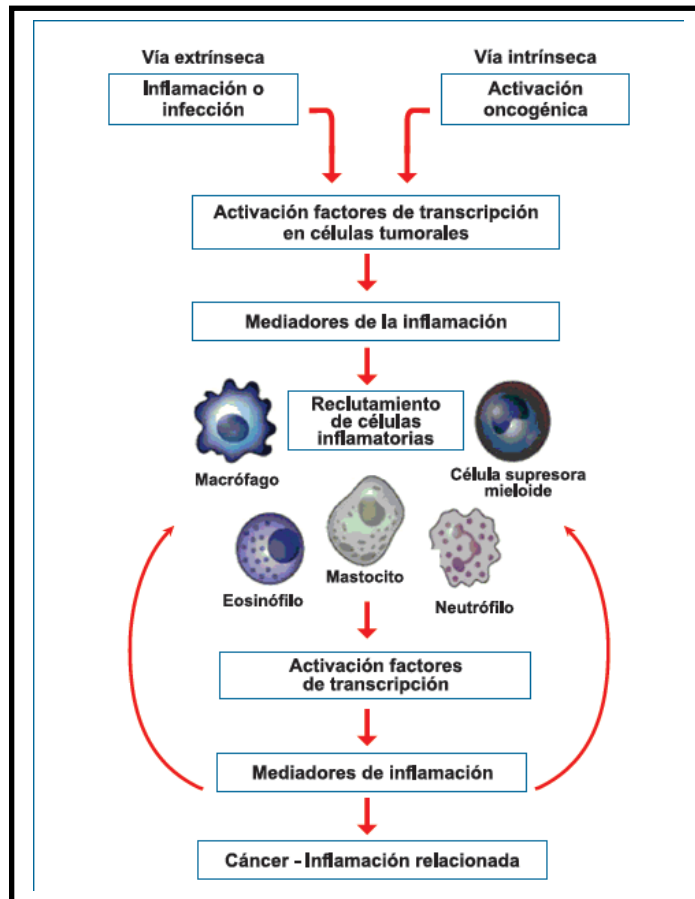


Figura 15: Adaptado de “Cancer-related inflammation (Mantovani et al., 2008)

En este sentido las células del estroma tumoral, incluyendo macrófagos, células dendríticas y fibroblastos producen citoquinas que atraen y reclutan más células inflamatorias elevando aún más la proliferación y la supervivencia. Los macrófagos asociados a tumor (MAT) pueden fomentar la invasión local al suministrar enzimas que degradan la matriz como metaloproteasas y proteasas de cisteína Catepsinas (Kessenbrock et al., 2010; van Kempen et al., 2006). Los MAT se pueden activar por la misma IL-4 producida por las células tumorales (Gocheva et al., 2010). También se ha descrito un modelo experimental de tumores mamarios metastásicos, donde los MAT suministran el factor de crecimiento epidérmico EGF, mientras que recíprocamente las células tumorales estimulan a los macrófagos con CSF-1 (Qian and Pollard, 2010; Wyckoff et al., 2007).

TNF es una de las citoquinas de producción constitutiva en el microambiente tumoral característica de muchos tumores malignos cuya presencia además se asocia con un mal pronóstico (Chew et al., 2010; Michalaki et al., 2004). TNF facilita

directamente el desarrollo tumoral mediante la regulación de la proliferación y supervivencia de las células neoplásicas o bien ejerce sus efectos indirectamente a través de células endoteliales y otras células inflamatorias del microambiente tumoral. Ratones deficientes en TNF o sus receptores han reducido la susceptibilidad a desarrollar tumores de piel inducidos químicamente y desarrollan menos metástasis experimentales (Balkwill, 2009; Popivanova et al., 2008) . TNF también puede actuar promoviendo la proliferación y supervivencia de muchas líneas de células tumorales sin inducir la diferenciación celular o promover la supervivencia tumoral a través de la inducción de moléculas anti-apoptóticas y otros factores de crecimiento EGFR y TGF- α (Shishodia and Aggarwal, 2004).

Por otro lado, TNF colabora con la angiogénesis a través de varios factores angiogénicos como IL-8 y VEGF, y es un regulador crítico de VEGF a través de la vía de JNK y dependiente de AP-1 (Johnston et al., 2009).

El pretratamiento de animales con TNF aumenta las metástasis pulmonares en un fibrosarcoma experimental, mientras que la neutralización del TNF endógeno con un anticuerpo anti-TNF reduce la metástasis de pulmón (Orosz et al., 1993) y el desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis (Popivanova et al., 2008). Además, en células tumorales TNF tiene un rol en la migración y metástasis dependiente de NF- κ B a través de la inducción del receptor de quimosinas CXCR4, la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), IL-8 y la molécula de adhesión intercelular-1 (Kulbe et al., 2005; Stathopoulos et al., 2008) y es un fuerte inductor de la vía TNF/NF- κ B/SNAIL que está implicada en la inducción de TEM y aumento de la capacidad metastásica (Wu and Zhou, 2010)

Referente al rol de NF- κ B en tumores, un aumento de su actividad es evidente en varios tipos tumorales como carcinoma de células no pequeñas de pulmón (Mukhopadhyay et al., 1995) , cáncer de tiroides (Gilmore et al., 1996) leucemias de linfocitos T y B (Bargou et al., 1996) , melanoma (Devalaraja et al., 1999) , cáncer de colon (Dejardin et al., 1999), de vejiga (Sumitomo et al., 1999), de pulmón (Basseres et al., 2010) y de mama (Sovak et al., 1997). Alteraciones cromosómicas en los genes de los miembros de la familia de NF- κ B brindaron evidencias adicionales sobre el rol de este factor de transcripción en la oncogénesis. La activación constitutiva de NF- κ B produce un incremento en la expresión no solo de genes involucrados con procesos inflamatorios sino también anti-apoptóticos y aquellos relacionados con el ciclo celular, adhesión celular, y angiogénesis (Grivennikov et al., 2010). Algunos de los mecanismos descriptos para su activación constitutiva son la secreción autócrina de mediadores

inflamatorios, mutaciones o sobre-expresión de ligandos o receptores, expresión aberrante o sobre-expresión de quinasas claves como IKK, entre otros (Chaturvedi et al., 2011). En este sentido, encontramos que NF- κ B activado por TNF induce la proliferación de células T47D vía un aumento de la expresión de Ciclina D1. Asimismo, NF- κ B es requerido aún ante la señal proliferativa de los estrógenos, dado que cuando bloqueamos su activación observamos una inhibición de la respuesta a TNF y a 17- β -Estradiol (Rubio et al., 2006) .

1.2 Teorías sobre la heterogeneidad tumoral

Hasta aquí se realizó una breve introducción de los requerimientos que una célula debe adquirir para sufrir una transformación tumoral y que garantice, de este modo, la progresión tumoral. Se detallaron algunas de las vías desreguladas en cuanto a la adquisición de la capacidad proliferativa, resistencia a apoptosis, capacidad metastásica y de angiogénesis, así como las señales circundantes del micro-entorno tumoral que pueden favorecer el desarrollo de una neoplasia en las distintas etapas.

Sin embargo, cuando se analizan las características de un tumor determinado, se puede observar una gran heterogeneidad en cuanto a las características antes mencionadas. Las células tumorales pueden mostrar distintos perfiles que incluyen, diferencias en la morfología celular, expresión génica, metabolismo, proliferación y potencial metastásico (Marusyk and Polyak, 2010). Este fenómeno se produce dentro de los tumores (Heterogeneidad intratumoral) y entre los tumores (heterogeneidad intertumoral) por ejemplo los distintos subtipos de cáncer de mama o próstata, entre otros. La heterogeneidad de las células cancerosas presentan desafíos significativos en el diseño de terapias eficaces, por lo tanto las investigaciones que permitan una mejor comprensión de las causas de la heterogeneidad pueden permitir una mejor comprensión de la progresión de la enfermedad. Esta heterogeneidad fue observada en muchos tipos de tumores, entre los que podemos mencionar: cabeza y cuello (Califano et al., 1996), leucemias (Campbell et al., 2008), mama (Shipitsin et al., 2007), próstata (Alvarado et al., 2005).

Existen dos modelos que intentan explicar la heterogeneidad de las células tumorales dentro del tumor. Estos son los modelos de la evolución clonal o estocástico y el modelo de célula madre tumoral (CMT). Los modelos no son mutuamente

excluyentes, y se cree que ambos contribuyen a la heterogeneidad en cantidades variables en los diferentes tipos de tumores.(Shackleton et al., 2009).

1.2) A- Modelo de evolución clonal

El evolución clonal modelo se propuso por primera vez en 1976 por Peter Nowell (Nowell, 1976). Este modelo sugiere que los tumores surgen de una sola célula mutada, que cuando progresa puede acumular mutaciones adicionales. Estos cambios dan lugar a las subpoblaciones, y cada una de estas subpoblaciones tiene la capacidad de dividirse y mutar más. Esta heterogeneidad puede dar lugar a subclones que poseen un ventaja evolutiva sobre los otros dentro de la entorno de tumor, y estos subclones pueden llegar a ser dominantes en el tumor con el tiempo (Merlo et al., 2006; Swanton, 2012). Este modelo permitió la comprensión del crecimiento tumoral, el fracaso de tratamientos quimioterapéuticos y el aumento de la agresividad que se produce durante el proceso natural de formación de tumores (Swanton, 2012).

Esta variabilidad genética dentro de la población tumoral sería responsable tanto de la progresión del tumor, como de la existencia de diferentes células dentro de este (Durrett et al., 2011). Además, la heterogeneidad morfológica, proliferativa y funcional que se observa entre las células de un mismo tumor son debidas a influencias aleatorias que alteran el comportamiento de las células individuales dentro del tumor y que lo que determina que una célula adquiera la capacidad de iniciar un tumor depende de que ocurran las influencias adecuadas y por tal motivo según este modelo sería imposible aislar la fracción de células capaces de iniciar el tumor (Dick, 2009).

1.2) B- Modelo de Células Madre Tumorales

El modelo considera que sólo una parte de la población celular dentro del tumor tiene la capacidad de regenerarlo cuando son implantadas en animales. Estas células se llaman células madre tumorales (CMT) y se caracterizan por la capacidad tanto de auto-renovación como de diferenciación a la progenie no CMT. Además presentan mayor resistencia a la apoptosis inducida por drogas quimioterapéuticas y mayor capacidad metastásica (O'Brien and Barry, 2009; Talmadge and Fidler, 2010) y serían las responsables de la persistencia de la enfermedad.

Asumiendo entonces la existencia de CMT, se podría interpretar que la heterogeneidad observada entre las células de un tumor, son el resultado de cambios epigenéticos, así como el acúmulo de mutaciones, que luego son seleccionadas

acorde a las ventajas adaptativas tanto de las CMT como de la progenie (Shackleton et al., 2009). Existen múltiples evidencias de la existencia de CMT en distintos tipos de tumores, incluyendo las leucemias (Lapidot et al., 1994), glioblastoma (Singh et al., 2004), cáncer de mama (Al-Hajj et al., 2003) y el cáncer de próstata (Maitland and Collins, 2008).

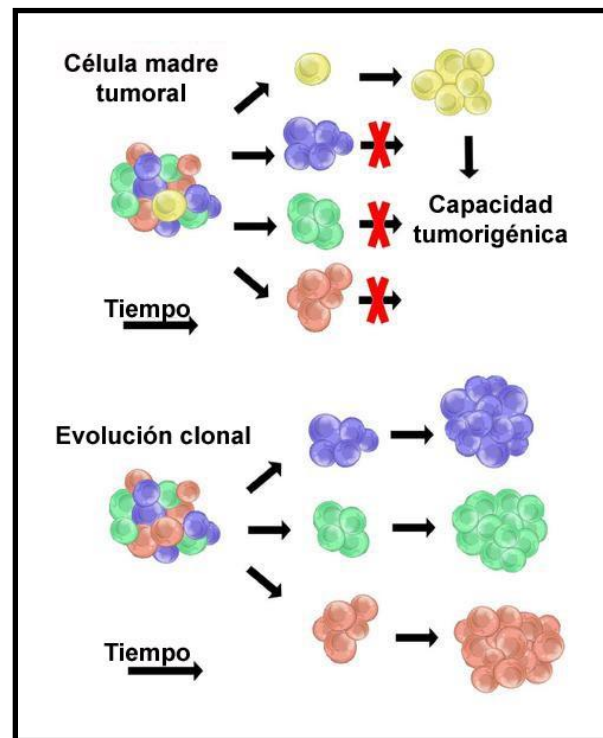


Figura 16: Modelo de Célula Madre tumoral y Modelo de evolución clonal.

En cuanto a su origen, aún no ha sido esclarecido, pero se considera que podrían originarse por mutaciones o cambios epigenómicos a partir de células maduras diferenciadas presentes en cada tejido, o bien de células madre normales residentes en los tejidos, así como muy tempranamente, de células madre embrionarias totipotentes y luego persistir en los tejidos hasta la recepción de un contexto de señales y estímulos adecuado que dispare la iniciación tumoral.

Cualquiera sea su origen, es sabido que las CMT comparten características comunes con las células madre normales, o *stem cells* (SC). Por lo tanto a continuación se describen algunos conceptos básicos respecto de la biología de las células madre.

1.3- Conceptos básicos sobre células madre

Las células madre (SC) son células que están presentes en todos los organismos multicelulares y que se definen originariamente como células indiferenciadas con capacidad ilimitada de auto-renovación, a lo largo de toda la vida del individuo y que pueden diferenciarse en una amplia gama de tipos celulares (Hall and Watt, 1989; Morrison et al., 1997). Por otro lado el término célula progenitora se emplea para aquellas células que están ya comprometidas a diferenciarse hacia un número reducido de linajes celulares, siendo consideradas como células intermedias entre SC y células diferenciadas (Steindler, 2007). Actualmente se mantiene esta definición simplificada del concepto de SC, aunque las últimas investigaciones sobre estas células han llevado a la caracterización de las SC como las únicas células que mantienen un equilibrio entre quiescencia, migración, proliferación y diferenciación (Florian and Geiger, 2010).

Las SC tienen la capacidad de sufrir diferentes tipos de división que aseguran su auto-renovación. Por un lado pueden ocurrir: i) divisiones simétricas en la cuales se originan 2 células hijas idénticas que mantienen las propiedades de las SC o ii) divisiones asimétricas en las cuales se originan 1 célula idéntica a SC, perpetuando esta célula indiferenciada y una célula progenitora con una capacidad de auto-renovación limitada, que puede sufrir varios ciclos de división celular antes de diferenciarse en un determinado tipo celular maduro (Morrison and Kimble, 2006). Existe un equilibrio entre ambos tipos de división modulado por señales extrínsecas e intrínsecas (Florian and Geiger, 2010).

Diferentes rutas de señalización que modulan la auto-renovación y la diferenciación de las SC, tales como las rutas Wnt/ β -Catenina (Kirstetter et al., 2006), Notch (Rock et al., 2011), Hedgehog (Ingham and McMahon, 2001), TGF- β (James et al., 2005), y distintos factores de crecimiento que activan Map quinasas, como el factor de crecimiento epidérmico (Dvorak et al., 2005), Hippo (Lian et al., 2010) y en especial la respuesta inflamatoria a través de la activación de NF- κ b (Dreesen and Brivanlou, 2007).

A lo largo del proceso de diferenciación las SC van perdiendo su capacidad de generar distintos tipos celulares y ganando una función especializada hasta alcanzar un estado de diferenciación específico en el tejido donde reside. Esta capacidad cada vez más reducida de diferenciación a múltiples tipos celulares transita desde el estado de totipotentes con la capacidad de generar todos los tejidos como ocurre en el embrión, a pluripotentes y hasta unipotentes, como son las SC residentes en tejidos (Ji et al., 2010; Van Keymeulen et al., 2011)

Las SC también pueden ser clasificadas según su origen en células Madre Embrionarias (ESC) que son células pluripotentes que se originan en el blastocito y son las únicas células madre con potencial replicativo ilimitado (Odorico et al., 2001), fetales, perinatales que provienen de placenta y cordón umbilical o bien adultas (ASC)

- (ASC): también denominadas células madre somáticas, son células madre oligopotentes que se localizan en los tejidos del individuo adulto manteniéndose quiescentes hasta que responden a señales de lesión y reparan el tejido (Li and Clevers, 2010) o simplemente para reponer células que van muriendo. La medula ósea fue el primer lugar donde se identificaron, sin embargo, no se limitan solo a estos tejidos, están presentes en la mayoría de los tejidos adultos y por lo tanto se las denomina tejido específicas (Behr et al., 2010; Mimeault et al., 2007). Estas células madre se localizan en determinadas regiones denominadas nichos, los cuales proporcionan un microambiente especial para la regulación y el mantenimiento de sus características (Jones and Wagers, 2008; Moore and Lemischka, 2006). Su función en el tejido determinado es la de mantener la homeostasis natural y regenerar los daños que pueden producirse mediante el control de su auto-renovación y diferenciación (Mimeault and Batra, 2008) y se cree que la desregulación de este equilibrio podría ser la causa de la tumorigénesis (Rossi et al., 2008)

- Células Madre Pluripotentes Inducidas (IPS): Como su nombre lo indica son células pluripotentes obtenidas mediante reprogramación de células diferenciadas adultas (Ebben et al., 2011). Su similitud ha sido demostrada mediante la obtención de ratones viables derivados de IPS (Boland et al., 2009; Zhao et al., 2009)

En el año 2006 Takahashi y Yamanaka identificaron 4 factores transcripcionales, OCT3/4, Sox2, KLF4 y c-MYC como los principales responsables del mantenimiento de las características pluripotenciales de las ESC, y mediante su introducción en fibroblastos de ratón consiguieron el establecimiento de la primera línea celular pluripotente a partir de células diferenciadas (Takahashi and Yamanaka, 2006). Un año después se consiguió la generación de células iPS humanas a partir de células somáticas maduras (Takahashi et al., 2007). En la actualidad se ha demostrado la posibilidad de obtener iPS sin introducir c-MYC (Nakagawa et al., 2008) e incluso se han generado iPS humanas a partir de cordón umbilical introduciendo solo SOX2 y OCT4 (Giorgetti et al., 2009) y a partir de SC neuronales utilizando OCT4 (Kim et al., 2009). Su investigación como posible herramienta terapéutica es de absoluta relevancia, evitando los conflictos éticos en el uso de SC de origen humano.(Ebben et al., 2011). Sin embargo, hasta el presente el uso de esta herramienta en la terapia

regenerativa conlleva algunos problemas, ya que, a pesar de ser preparadas por reprogramación a partir de células del mismo paciente, pueden ser rechazadas inmunológicamente (Zhao et al., 2011). Además su diferenciación es complicada y existe el riesgo de generación de teratomas (Brunt et al., 2012).

1.4- Evidencias que sustentan el modelo de célula madre tumoral

De acuerdo a lo descrito en cuanto a la biología de las células madre, algunas de estas propiedades son comunes a las actualmente descritas como células madre tumorales (CMT).

En la actualidad existen una gran cantidad de evidencias que indican que la mayoría de los cánceres dependen de una pequeña población de células, como denominamos anteriormente CMT (Reya et al, 2001; Huntly et al, 2005; Bao et al, 2006; Eramo et al, 2008) que son las responsables de la metástasis del tumor primario a sitios distantes en el organismo donde permiten regenerarlo. Estas evidencias han permitido postular con gran elocuencia, que los tumores puedan originarse a partir de la transformación maligna de células de la población SC del organismo (Kucia and Ratajczak, 2006).

Las CMT al igual que las SC, muestran una capacidad de autorrenovación ilimitada, que las hace esencialmente inmortales. En esta característica están involucradas varias rutas de señalización similares a las que participan en la autorrenovación de las SC, como las rutas Wnt, Notch, Hedgehog y NF- κ B (Jiang and Edgar, 2009; Kucia et al., 2012; Piscaglia, 2008; Piscaglia et al., 2008). Ambos tipos de células muestran la capacidad de sufrir 2 tipos de divisiones celulares que asegura su autorrenovación, simétrica y asimétrica y además comparten la capacidad de diferenciarse, aunque, mientras las SC se diferencian a una progenie normal, las CMT se diferencian anormalmente (Kucia and Ratajczak, 2006). En este sentido las CMT pueden dar lugar a cualquier tipo celular de la población tumoral, siendo esta progenie de células cancerosas más diferenciadas, las cuales muestran una capacidad limitada o nula de autorrenovación y están destinadas a detener su proliferación o morir (Piscaglia et al., 2008;)

También se ha observado que las CMT pueden mantenerse en un estado de quiescencia lo cual las hace más resistentes a los tratamientos quimioterapéuticos convencionales (Kucia and Ratajczak 2006; Piscaglia et al, 2008). Por otro lado las SC y las CMT tienen la capacidad de secretar factores de crecimiento, citoquinas y

factores angiogénicos y por lo tanto muestran una predisposición a mantener un crecimiento autócrino y para estimular la angiogénesis (Kucia and Ratajczak 2006, Piscaglia et al, 2008). Además se ha observado que existe un paralelismo entre la metástasis mediada por CMT y la movilización de las SC.

Otra característica que comparten las CMT y las SC son una elevada actividad aldehído deshidrogenasa (ALDH) (Ma et al., 2011b) y una alta expresión de transportadores de membrana dependientes de ATP que promueve la expulsión de drogas y por lo tanto han recibido el nombre de bombas de resistencia a multidrogas (MDR) (Lobo et al., 2007).

Diversos estudios han demostrado también que SC y CMT muestran una activa capacidad de reparación del DNA como roturas doble cadena la cual es mediada por la quinaxia telangiectasia mutada (ATM), por lo que muestran mayor resistencia a la apoptosis (Lobo et al, 2007; Kucia and Ratajczak 2006).

1.5- Señales involucradas en la autorrenovación y diferenciación de SC y CMT.

Como se mencionó anteriormente, las CMT y las SC tienen la capacidad de proliferar clonalmente. Otra característica común reside en el hecho de que tanto células tumorales metastásicas como SC tienen la capacidad de habitar y prosperar en varios ambientes del cuerpo humano. Estas similitudes otorgan ventajas en el estudio de la biología tumoral, ya que la comparación de rutas moleculares involucradas en la tumorigénesis, autorrenovación y diferenciación entre células tumorales y células madre, proporciona una herramienta importante en el estudio de la biología tumoral. Se conocen varias rutas de señalización necesarias para el mantenimiento y diferenciación de SC que se encuentran desreguladas en CMT y que soportan la hipótesis de las CMT como iniciadoras tumorales como la vía NF- κ B y TCF/ β -Catenina (Brivanlou et al., 2003; Sato et al., 2004).

1.5) A- Cascada de transducción de señal de TNF/NF- κ B

El rol del factor de transcripción NF- κ B descrito originalmente por su función en la respuesta inmune (Hayden 2004), tiene múltiples acciones biológicas, proliferación, desarrollo, expresión de moléculas de adhesión, migración, resistencia a la apoptosis, regulación de expresión de genes de citoquinas (Baldwin, 2001; Ghosh and Karin, 2002; Guttridge et al., 1999; Lin and Karin, 2003). La familia de proteínas de

NF- κ B es una de las más estudiadas y ha sido involucrada en algunos procesos celulares incluyendo respuestas a estímulos inmunes o inflamatorios, crecimiento celular y apoptosis (Colo et al., 2007; Rubio et al., 2006). Nos es sorprendente que este factor de transcripción esté involucrado en enfermedades como cáncer, artritis reumatoidea, sepsis y asma, dado que puede ser activado por la respuesta inflamatoria involucrada en estos procesos, entre otras múltiples señales.

La actividad de NF- κ B puede ser estimulada por una variedad de citoquinas inflamatorias, como por ejemplo el TNF.

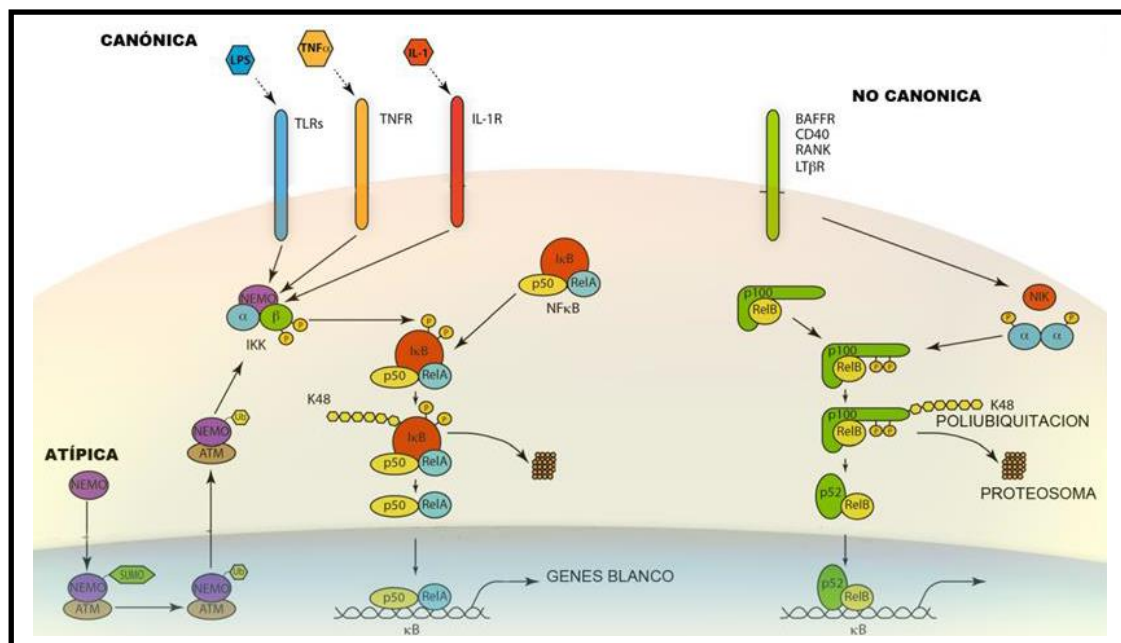


Figura 17: Vías de activación de NF- κ B. La vía *canónica* es activada por señales inflamatorias como citoquinas pro-inflamatorias y LPS bacteriano, estas señales activan el complejo IKK y la degradación de I κ B α . El complejo **NF- κ B** liberado (RelA/p50) transloca al núcleo donde activa la transcripción de sus genes blanco. La vía *no canónica* es activada por algunos miembros de la familia de Receptores de TNF que incluyen LT β R, BAFF y CD40L y lleva al procesamiento del precursor p100 y la liberación del complejo p52/RelB. La vía *atípica* activada por estrés genotóxico conduce a la translocación de NEMO al núcleo donde es sumoilado y posteriormente ubiquitinado mediado por la ataxia telangiectasia mutada (ATM). Adaptado de Bastian Hoesel, et. al.

En condiciones basales NF- κ B es retenido en el citoplasma por proteínas I κ B. La unión de TNF a su receptor activa una cascada de señales que activan la quinasa de I κ B (IKK) lo cual conduce a la fosforilación de I κ B marcándolo para su degradación, de este modo NF- κ B transloca al núcleo con aumento de su actividad transcripcional (Ghosh and Karin, 2002) con la subsecuente expresión de genes target, involucrados en la inducción de TEM, metaloproteasa 2 y 9, SNAIL, Vimentina y CD44 asociado al mantenimiento de características SC y en la metástasis de células tumorales

Recientemente se ha demostrado que HSC CD34+ que derivan de cordón umbilical tienen sobre-expresados los componentes de la ruta NF- κ B, incluyendo la expresión de receptores de TNF y de FGF y target transcripcionales como IL8 y Notch1. Se ha demostrado, además, que la activación de NF- κ B por TNF inhibe la diferenciación de células satélite de músculo esquelético (Bakkar and Guttridge, 2010). Sin embargo se conoce muy poco acerca del rol de NF- κ B en la autorrenovación y el mantenimiento de características de células madre. Recientes estudios sobre los niveles de expresión de componentes de la ruta NF- κ B en células ESC indiferenciadas y diferenciadas usando perfiles de expresión por microarrays, reveló que los componentes de la ruta NF- κ B están sobre-expresados en ESC y que esta expresión se reduce durante la diferenciación de las ESC (Armstrong et al., 2006). Estudios por inmunohistoquímica de RelA demuestra que su ubicación es predominantemente nuclear en células ESC indiferenciadas. El uso de inhibidores de la ruta de NF- κ B, como pirrolidinethiocarbamato (PTDC) que inhiben la translocación de RelA al núcleo, induce una diferenciación masiva en colonias ESC así como un significativo aumento en la apoptosis indicando que la actividad de NF- κ B es esencial para mantener la pluripotencia en ESC (Armstrong et al., 2006). Más aún, ha sido reportado que las CMT muestran un aumento en la ruta de señalamiento NF- κ B (Rajasekhar et al., 2011).

En relación a la inducción de TEM ha sido reportado que la activación de NF- κ B por TNF por ejemplo induce la expresión y aumenta la estabilidad de SNAIL quien inhibe la expresión de E-Cadherina (Wu & Zhou, 2010; Qin et al., 2008; Zhang et al., 2012). NF- κ B puede inducir la expresión de SNAIL a través de unión directa con su promotor (Julien et al., 2007). Además, la vía TNF/NF- κ B estabiliza SNAIL por un mecanismo que involucra la expresión de CSN2 quien inhibe la fosforilación y ubiquitinación de SNAIL a través de la disrupción de la unión a GSK3 y β -Trcp (Wu and Zhou, 2010). De hecho la expresión de SNAIL se ha detectado en células epiteliales y endoteliales de cáncer de mama mientras que es indetectable en células normales (Martin et al., 2005; Parker et al., 2004) y su expresión ha sido asociado con metástasis, recidivas y mal pronóstico (Peinado et al., 2007). Ha sido reportado previamente que en células de cáncer gástrico y de colon el tratamiento de TNF induce localización nuclear y activación de TCF/ β -Catenina a través de la supresión de la actividad de GSK3 β (Oguma, 2008). A su vez, SNAIL puede aumentar la activación de la ruta Wnt por interacción con β -Catenina y de este modo establecer una retroalimentación positiva para la transcripción dependiente de Wnt (Stemmer,

2008). De hecho, tanto β -Catenina como SNAIL son sobre-expresados en las células tumorales del frente invasivo, donde los niveles de TNF son elevados (Wu Y, 2010). Además, ha sido reportado que β -Catenina puede regular a NF- κ B favoreciendo rutas anti-apoptóticas en cáncer de páncreas (Kumaran, 2015).

1.5) B- Cascada de transducción de señal Wnt/ β -Catenina

La adhesión celular mediada por E-Cadherina también puede afectar la estabilidad de β -Catenina (Bienz y Clevers, 2000; Polakis, 2000). La proteína β -Catenina es usualmente secuestrada por Cadherinas en las uniones adherentes; la pérdida de E-Cadherina, induce la liberación de β -Catenina que usualmente es fosforilada por la glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β) en el complejo APC/Axina/GSK3 β y subsecuentemente degradada por la vía ubiquitina proteasoma.

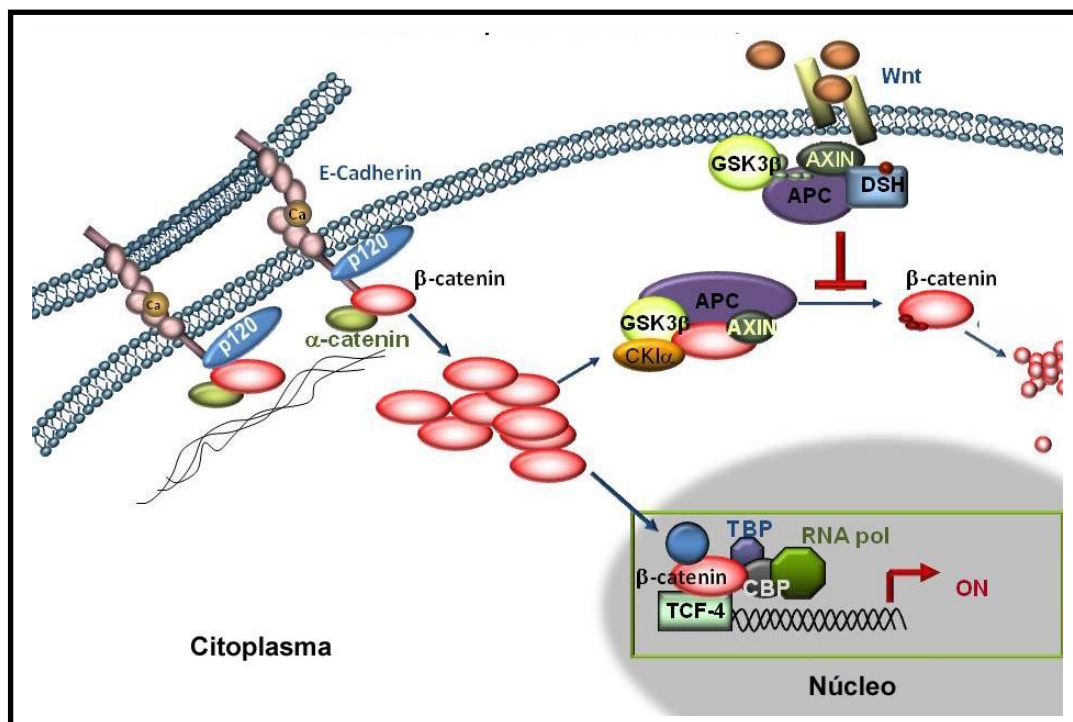


Figura 18: Ruta de señalamiento Wnt/ β -Catenina. Adaptado de "bioquimica.uab.es"

En algunos tipos de células tumorales como en el cáncer de colon, la pérdida de función de APC, mutaciones en β -Catenina o la inhibición de GSK3 β conduce a la estabilización de β -Catenina en el citoplasma y la subsecuente translocación de β -Catenina al núcleo donde se une a miembros de la familia a factores de transcripción TCF/LEF modulando la expresión de sus genes target entre los que se incluye c-MYC, CD44, Vimentina entre otros (Dreesen and Brivanlou, 2007). Esta ruta

se ha visto desregulada en diferentes tipos tumorales y ha sido demostrada su importancia en la biología de las CMT en leucemia (Chomel and Turhan, 2011) mama (Shen and Cao, 2012), hepático (Shen and Cao, 2012) y gástrico (McNutt et al., 2008). Su activación, es una característica clave de los cánceres epiteliales y se considera un evento crítico para la TEM implicada en metástasis (Aalaoui Jamali 2011; Hu and Fu 2012).

La activación de esta ruta ha mostrado ser crucial, además, en la autorrenovación en ESC y ASC en mamíferos, demostrándose que TCF/ β -Catenina está involucrada en la expresión de marcadores de pluripotencia como Oct3/4, Nanog y Rex1 (Sato et al, 2004). El aumento de esta vía ha sido asociada en el mantenimiento y autorrenovación de HSC y en el mantenimiento de la homeostasis del epitelio de la piel. En células diferenciadas la mayoría de la β -Catenina se encuentra asociada a E-Cadherina y α -Catenina en las uniones adherentes. En ASC y células madre del folículo β -Catenina se localiza en el citoplasma y en el núcleo (Dreesen and Brivanlou 2007). La delección de β -Catenina en ratones impide la correcta morfogénesis del folículo y pérdida del nicho SC, su estabilización conduce a la proliferación de las SC en el nicho y la regeneración del folículo (Blanpain et al, 2007).

Si bien la ruta de señalamiento Wnt es el principal mecanismo por el cual se produce la estabilización de β -Catenina por inhibición de GSK3, ésta también puede ser estabilizada por citoquinas inflamatorias que activan IKK y AKT, quienes estabilizan β -Catenina por inactivación de GSK3 o por fosforilación directa de β -Catenina estabilizándola.

De este modo la activación de AKT es crítica en el mantenimiento de pluripotencialidad en ESC. La expresión de dominantes negativos de PI3K o el uso de inhibidores de AKT como LY294002 en ESC conducen a su diferenciación (Paling et al., 2004). Análisis por *microarrays*, indican que componentes de esta ruta están sobre-expresados en ESC indiferenciadas (Armstrong et al., 2006). El tratamiento con inhibidores de AKT, confirman la inhibición de GSK3 con una disminución en los marcadores de pluripotencia tales como OCT4, Nanog y SOX2, indicando que las ESC pierden la capacidad de pluripotencia compatible con la diferenciación iniciada, además, considerando que las rutas Wnt/ β -Catenina y NF- κ B son activadas río debajo de AKT, la pérdida de pluripotencialidad puede ser atribuida a la activación insuficiente de estas dos vías (Dreesen y Brivanlou 2007).

Además ha sido recientemente demostrado que NF- κ B puede activar la ruta Wnt e inducir desdiferenciación de células epiteliales de colon con la adquisición de características de células iniciadoras de tumor, por un mecanismo que involucra la

activación de NF- κ B y su interacción con β -Catenina, lo cual soporta la idea de la importancia del microambiente inflamatorio para la desdiferenciación y generación de células iniciadoras de tumores (Schwitalla et al., 2013).

1.6- Métodos para la Identificación de células madre cancerígenas

Una de las principales características empleadas la para identificación de CMT la constituye la expresión diferencial de marcadores de superficie específicos por parte de estas células. Se han identificado una gran variedad de marcadores para la identificación de CMT dentro de los que se incluyen en la Tabla 3.

Tabla 3: marcadores de células madre tumorales

Fuente de células madre	Marcadores
Carcinoma de cerebro	CD133 ⁺ , nestin ⁺ , GFAP ⁺ , β -tubulin ⁻
Gloma	CD133 ⁺
Meduloblastoma	CD133 ⁺ , Hoechst 33342 dye exclusion, nestin ⁺
Cancer de mama	CD44 ⁺ , CD24 ^{low} , lineage ⁻ , Oct4 ⁺ , Cx43 ⁻
Cancer de prostata	CD44 ⁺ , $\alpha_2\beta_1$ ^{hi} , CD133 ⁺
Leucemia aguda o cronica	CD34 ⁺ , CD38 ⁻ , CD123 ⁺
Mieloma múltiple	CD138 ⁻ , CD19 ⁺

En particular, CD44 es una proteína de membrana que funciona como molécula de unión célula-célula y célula matriz extracelular a través de la unión a ácido hialurónico, que es un componente importante de la matriz extracelular y principal componente del nicho *stem cell* (Basakran, 2015; Gee et al., 2004). La proteína CD44, se encuentra expresada en muchos tipos celulares, pero particularmente se la encuentra sobre-expresada en células hematopoyéticas, células madre y células tumorales con alta capacidad metastásica (Basakran, 2015) . En relación a ello, es sabido que el gen de CD44 presenta una gran variedad de isoformas por *splicing* alternativo (Basakran, 2015; Gee et al., 2004; Prochazka et al., 2014). La variante más común denominada CD44s o *estándar* de 85KDa aproximadamente se expresa en una

gran variedad de tipos celulares (Gee et al., 2004; Prochazka et al., 2014). Sin embargo células tumorales expresan variantes por splicing que varían su peso molecular entre 110 y 250 KDa (Gee et al., 2004; Prochazka et al., 2014) y la expresión de estas variantes están asociadas al incremento en el potencial metastásico. Si bien la expresión de CD44 puede ser regulada por múltiples vías, su regulación por el factor de transcripción NF- κ B y AP-1 en células de cáncer de mama triple negativo MDA MB231, ha sido asociada al aumento de su capacidad metastásica (Smith et al., 2014)

Aparte del estudio de la expresión de marcadores de superficie, otro método utilizado para la caracterización y aislamiento de CMT consiste en la capacidad de exclusión del colorante Hoechst 33342, que es mediada por sobreexpresión de las bombas de eflujo MDR, entre las que se incluyen diferentes transportadores ABC (Gilbert y Ross 2009; Lobo 2007). De este modo, las células con capacidad de expulsión de Hoechst se las conoce comúnmente con el término en inglés “side population” y se ha observado que esta fracción de células está enriquecida en CMT (Chistgen 2012, Haraguchi 2006), Nakanichi 2010; Wu y Alman 2008) y se ha propuesto que esta característica está fuertemente asociada al aumento en la capacidad de resistencia a terapias quimioterapéuticas y con ello a la recidiva del cáncer (Cheryl A Sherman Baust 2011, Vijay Rathod 2014). Las CMT frecuentemente expresan marcadores de pluripotencialidad como por ejemplo OCT4, SOX2 y NANOG y por lo tanto han sido utilizados para caracterizar células con características CMT.

En la actualidad se han desarrollado varios métodos para el estudio in vitro de propiedades stem cell en células tumorales, como por ejemplo, de proliferación en condiciones reducidas de nutrientes, capacidad para originar unidades formadoras de colonias, formación de esferas, adhesión, migración e invasión; y ensayos in vivo de tumorigenicidad, capacidad metastásica y habilidad para reconstruir las características del tumor original (Saini y Shoemaker 2010). La capacidad tumorigénica de las CMT aisladas es generalmente ensayada mediante su inyección en ratones inmunodeficientes (La prota 2012; Shackleton 2009).

Además de los marcadores a los que se hizo referencia, existen evidencias muy actuales que demuestran que hay otra molécula, originalmente considerada un coactivador, luego un oncogén, de expresión elevada en tumores, que recientemente se demostró ser un factor necesario para mantener la pluripotencia. Por ello, a continuación se describe a esta molécula y sus acciones biológicas.

1.7- Coactivadores de receptores nucleares, familia p160

La familia de coactivadores de receptores esteroideos (SRC's) o p160 reúne a tres moléculas agrupadas por su alta homología y un peso molecular de 160KDa denominadas: SRC-1 (Onate et al., 1995) o NcoA1 (*Nuclear receptor coactivator 1*); TIF2 (*Transcriptional Intermediary Factor (TIF) 2*), también conocido como GRIP1 (*glucocorticoid interacting-receptor protein 1*), SRC-2, NCoA2 (Hong et al., 1997) y finalmente RAC3 (*RAR-associated coactivator-3*) (Anzick et al., 1997). Los primeros miembros identificados mediante ensayos de interacción con receptores esteroideos en el año 1995 y 1996, respectivamente, fueron SRC-1 (Onate et al., 1995) y TIF2 (Voegel et al., 1996), por ello el nombre de la familia. Su tercer miembro, RAC3 fue descubierto en 1997 en una región cromosómica amplificada de cáncer de mama y ovario (Anzick et al., 1997).

Si bien en un principio se consideraba que estas moléculas en cantidades limitantes que hacían funcionar a los factores de transcripción no eran más que un “puente” o adaptador con la maquinaria basal transcripcional (Gill and Ptashne, 1988), hoy se sabe que los coactivadores por si mismos aumentan marcadamente la capacidad transcripcional de los distintos factores.

En general, los coactivadores aumentan la actividad transcripcional sin unirse directamente al ADN, sino interaccionando indirectamente con otras proteínas que sí se unen. Dentro de los mecanismos mediante los cuales coactivan, incluyen el reclutamiento más eficiente de la maquinaria basal de transcripción y actividades enzimáticas propias o de otras proteínas asociadas. Sus actividades enzimáticas *per se* en general producen el remodelamiento de la cromatina por fosforilación dependiente de ATPasas, acetilaciones como la del coactivador general de unión a CREB (proteína de unión a elementos regulatorios de AMPc) (CBP/p300), SRC's; metilaciones como la metil transferasa de arginina asociada a coactivadores (CARM-1) y ubiquitinaciones como E6-AP (*associated protein of ubiquitin-activating enzyme 6 (E6)*). A su vez, la asociación de los factores de transcripción y de los coactivadores a un determinado promotor se encuentra regulada temporalmente (Planas-Silva et al., 2001) llevando a un proceso ordenado y coordinado (Liu et al., 2001).

Los tres miembros de la familia de p160 interaccionan con receptores nucleares (NRs) de forma ligando dependiente, y aumentan su actividad transcripcional en forma dosis dependiente. Las preferencias de los NRs a

diferentes coactivadores está vinculada con la estructura del dominio de unión al ligando (LBD) de los NRs (Darimont et al., 1998; Ding et al., 1998).

Actualmente la diversidad de funciones halladas para algunas de estas moléculas excede su acción como coactivador, con funciones menos esperadas relacionadas con el *splicing* del ARN o el control de reacciones citoplasmáticas como la traducción, funciones mitocondriales y el tráfico intracelular, tal como hemos demostrado recientemente (Yu et al., 2007). Sumándose a la importancia de los coactivadores se postula que la formación de complejos multiprotéicos tiene una función integradora de múltiples vías de señalización celular que puede permitir al genoma censar el impacto del microambiente celular de tal manera que los coactivadores puedan organizar la expresión de "grupos funcionales" de genes que participan en la respuesta a un régimen regulatorio específico, por ejemplo los implicados en el metabolismo, el crecimiento, la diferenciación o la muerte celular. Entonces, los coactivadores, a través de su asociación específica a determinados factores de transcripción, que a su vez controlan la expresión de genes blanco específicos, podrían estar desempeñando ese rol integrador para una respuesta eficiente (Lonard and O'Malley, 2006).

1.7) A- Estructura general de los SRC's

Los integrantes de la flia. de SRC's tienen una similitud de secuencia de 50-55%, y una identidad de secuencia de 43-48% (Figura 1). comparten una estructura común que incluye un dominio básico de hélice-vuelta-hélice en el extremo N-terminal, un dominio de homología Per/ARNT/Sim (PAS), una región central de interacción con los NRs (RID) con tres motivos LXXLL (donde L es leucina y X es cualquier aminoácido) que forma una hélice-alfa anfipática que se une la hendidura hidrofóbica de los LBD (dominio de unión a ligando) de los NRs luego de la unión del ligando (Shiau et al., 1998). Aunque mutaciones en alguno de los tres motivos de LXXLL (L1, L2 y L3) anulan la interacción del SRC con los NRs, se vio que diferentes motivos de LXXLL y el contexto de la secuencia donde se encuentran, contribuyen a la unión selectiva de diferentes NRs (Torchia et al., 1998). A su vez, poseen dos dominios de activación transcripcional C-terminal (AD1 y AD2) (McKenna et al., 1999). La región AD1 es responsable de la interacción con el coactivador general de unión a CREB (CBP) y p300 (Onate et al., 1998), mientras que la región AD2 es capaz de interaccionar con metil

transferasas, que provocan el remodelamiento de la cromatina en forma local y el ensamblado de la maquinaria de transcripción en el promotor (Chen et al., 1999; Koh et al., 2001).

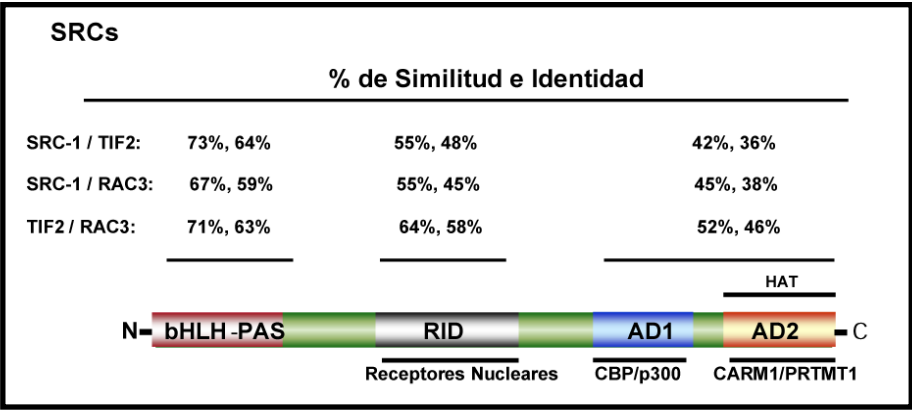


Figura 19. Esquema de los SRC's con sus dominios conservados. Básico de hélice-vuelta-hélice (bHLH); dominios homólogos a Per/ARNT/Sim (PAS); dominio de interacción con receptores nucleares (RID), dominio de activación transcripcional (AD1 y AD2).

1.8- RAC3

RAC3 fue descubierto en simultáneo por varios grupos de investigación, lo que derivó en que tome diferentes nombres al mismo tiempo: 1) Mediante el sistema de doble híbrido de levadura, se clonó el coactivador asociado al receptor del ácido retinoico (RAR), RAC3 (*RAR-associated coactivator-3*) y se demostró que podía interaccionar con múltiples NRs aumentando la actividad transcripcional del receptor de andrógenos (AR) y progesterona (PR) (Li et al., 1997a). 2) Se aisló a p/CIP (p300/CBP *cointegrator-associated protein*) interaccionando con el dominio C-terminal de CBP y con ER (Torchia et al., 1997). 3) Usando RAR??como cebo en el sistema simple híbrido de levaduras, se identificó a ACTR (*activator of thyroid and retinoic acid receptor*) y se demostró que interacciona con los NRs, CBP y p/CAF (Li et al., 1997b). Este estudio mostró además que ACTR posee actividad HAT. 4) Recorriendo una biblioteca de expresión de ADN copia del receptor tiroideo (TR), se aisló un clon que codificaba para TRAM-1 (*thyroid receptor activator molecule-1*) y se demostró que interaccionaba con TR y otros receptores de manera ligando dependiente (Takeshita et al., 1997). 5) En base a la interacción con los LBD de ER se identificó a SRC-3 (*steroid receptor coactivator-3*) y se

demostró que tenía mayor afinidad por ER α que por ER β (Suen et al., 1998). 6) Se observó a este coactivador amplificado en cáncer de ovario y mama, por esta razón también se lo denomina AIB1 (*amplified in breast cancer 1*)(Anzick et al., 1997).

1.8) A- Rol fisiológico de RAC3: modelo de ratón RAC3-deficiente

En ratones RAC3^{-/-} machos, la función reproductiva está levemente reducida, mientras que en hembras el desarrollo y las funciones del sistema reproductivo son anormales. Los niveles de estrógenos están reducidos causando un retraso en el desarrollo puberal evidenciado por un retraso en la abertura de la vagina y el desarrollo de las glándulas mamarias. Además, el desarrollo alveolar de las glándulas mamarias en respuesta a estímulos combinados de estrógeno y progesterona, disminuye significativamente en hembras RAC3^{-/-} (Xu et al., 2000).

Por otro lado, los ratones RAC3^{-/-} son más pequeños que los *wild type*, y muestran en general, un retraso madurativo. Esto sugiere que RAC3 es requerido para el crecimiento normal a pesar de que se observó que los niveles de la mayoría de los receptores nucleares aparecen intactos. Mientras que sí se observó que decrecen significativamente los niveles de IGF-1 y falla su respuesta (Yu et al., 2007).

1.8) B- Caracterización y modo de acción de RAC3

El gen de RAC3 en humanos denominado *ncoa3* (*homo sapiens nuclear receptor coactivator 3*) tiene una longitud de 155021pb y mapea en el brazo largo “q” zona de bandeo 12 del cromosoma 20 del genoma humano (20q12) (Xu et al., 2000), específicamente entre las posiciones 16326949-16481709 (NG_016810.1, NCBI *Reference Sequence*). El gen codifica un transcripto de 7935pb, contiene 23 exones y traduce a una proteína de 160KDa, entre el exón 2 al 22.

La proteína de RAC3 posee un 40% de similitud con el resto de la familia. A través del dominio bHLH-PAS puede interactuar con Miogenina, MEF-2C (*myocyte enhancer factor-2 MEF-2*) y el factor activador transcripcional (TEF) (Belandia and Parker, 2000; Chen et al., 2001) . A su vez este dominio estaría involucrado en la unión al ADN y la heterodimerización entre proteínas que también poseen este dominio [38]. Posee una región rica en Serina y Treonina por la que puede

interactuar con activadores de la transcripción como E2F (Louie et al., 2006) y STAT (Kuang et al., 2004) (Figura 3).

Por otro lado, dentro de su dominio bHLH se encuentra una señal de localización nuclear bipartita (NLS) hallada mediante estudios de mutagénesis dirigida donde se identificó a dos grupos de aminoácidos básicos interdependientes entre los residuos 16-38 que son necesarios para la localización nuclear (Yeung et al., 2006). RAC3 tiene seis motivos consenso LXXLL, con aminoácidos cargados que forman las hélices anfipáticas de interacción con dominios hidrofóbicos de diversas proteínas y en particular con los NRs. En su estructura posee dos dominios de activación transcripcional intrínsecos (AD1 y AD2). Siendo AD1 responsable de la interacción con histonas acetil-transferasas como CBP (Werbajh et al., 2000; Yan et al., 2006).

Además también se ha reportado que RAC3 podría contener una señal de exportación nuclear (NES) CRM1-dependiente en el extremo C-terminal, particularmente entre los aminoácidos 1033-1085 que contiene dos regiones ricas en Leucina (LCD4 y LCD5) que se asemejan a sitios consenso de exportación nuclear (Qutob et al., 2002).

RAC3 posee actividad HAT fuerte y además, es capaz de reclutar a los coactivadores generales CBP y p/CAF, formando un complejo multiprotéico de coactivación (Li et al., 1997a). El dominio AD2 puede interaccionar con la proteína Arginina metil transferasa (PRMT) PRMT-1 y CARM-1 (Chen et al., 1999; Koh et al., 2001), así como con el factor de transcripción AP-1 (Kuang et al., 2004).

RAC3 posee múltiples sitios de fosforilación por los que puede regularse su actividad, localización y vida media que son blanco de diversas quinasas y fosfatasas como se muestra en la Figura y que serán descritos más adelante en esta tesis.

Respecto de su expresión tejido-específica o constitutiva basados en ensayos de *northern blot*, la expresión del gen de RAC3 fue localizada en placenta, páncreas, pulmón, riñón, cerebro, hígado, útero, pituitaria, glándula mamaria y testículos (Li and Chen, 1998; Li et al., 1997a; Takeshita et al., 1997; Xu et al., 2000). La proteína se encontró expresada en testículos, pulmón, cerebro, corazón y glándula mamaria (Torchia et al., 1997; Xu et al., 2000). En todos los casos, en condiciones normales, su expresión es muy limitada y de difícil detección por *western blot*.

1.8) C- RAC3 no es solo un coactivador de receptores nucleares

En el año 2000 nuestro grupo descubrió que RAC3 también es coactivador de NF- κ B (Werbajh et al., 2000), factor de transcripción no esteroideo y que es clave no solo en la respuesta inflamatoria, como se explicó al comienzo de la introducción, también participa en el desarrollo tumoral regulando la expresión de genes relacionados con la adhesión celular, proliferación y anti-apoptóticos y mantenimiento de células madre tumorales (Figura 19). Posteriormente, otros autores demostraron que también pueden interaccionar y promover significativamente la actividad transcripcional de otros factores de transcripción no esteroideos como la proteína de activación-1 (AP-1)(Mussi et al., 2006; Yan et al., 2006), E2F (Mussi et al., 2006) y STAT6 (Arimura et al., 2004), entre otros. En resumen RAC3 coactiva también a muchos factores de transcripción no esteroideos.

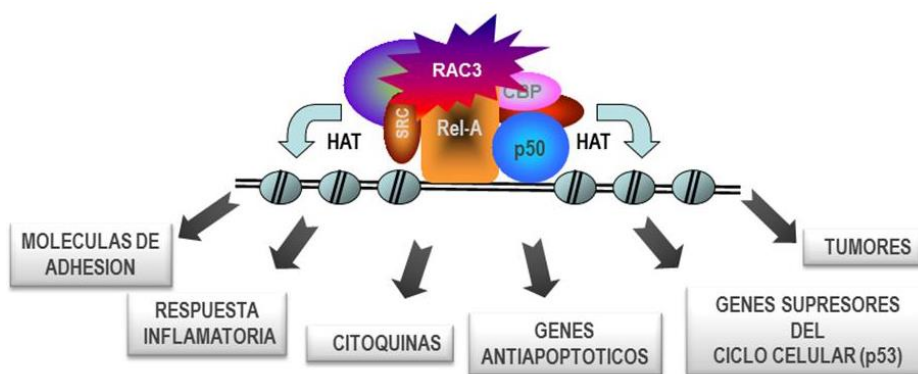


Figura 19: RAC3 es coactivador del Factor de transcripción no esteroideo NF- κ B.

1.8) D- Localización subcelular de RAC3

La localización subcelular es un aspecto muy importante en el control de la actividad tanto de los NRs como de factores de transcripción y quinasas, ya que determina su posibilidad de interaccionar específicamente con otras moléculas y sustratos específicos y finalmente, la respuesta celular ante determinadas señales, pudiendo resultar por ejemplo, en la muerte celular o la supervivencia. En este contexto la actividad de RAC3 también es regulada por su localización subcelular y tráfico intracelular.

Como se describió anteriormente RAC3 posee una secuencia bipartita de localización Nuclear (NLS) (Li et al., 2007a; Yan et al., 2006) y su translocación nuclear es mediada específicamente por la importina $\alpha 3$. En líneas generales RAC3 se encuentra translocando continuamente entre citoplasma y núcleo, pero se ha demostrado que su localización predominante es altamente dependiente del tipo celular y de su estado de diferenciación.

Muchos trabajos lo han descrito con una ubicación predominantemente nuclear en líneas celulares como HeLa (línea celular epitelial humana derivada de cáncer cervical), MCF-7 (línea celular epitelial de cáncer de mama humana), GH3 (línea celular tipo epitelial derivada de tumor pituitario de rata), COS-1 (línea celular tipo fibroblástica derivada de riñón de mono), CV-1 (línea celular fibroblástica derivadas de riñón de mono) (Long et al., 2010), así como también en meningiomas (Carroll et al., 2000) o tejidos de tumor de mama (List et al., 2001), entre otros.

Sin embargo, también se ha reportado su ubicación predominantemente citoplasmática, en tejidos del ratón en desarrollo, incluyendo páncreas, pulmones y músculo (Qutob et al., 2002), mientras que el mismo grupo observó una tinción nuclear intensa en células de la granulosa del folículo que rodea el ovocito. Otros análisis sobre cortes de tejido a su vez también muestran un predominio en la localización citoplasmática de RAC3 (Kuang et al., 2004; List et al., 2001).

Al mismo tiempo, se ha demostrado la translocación de RAC3 al núcleo y su fosforilación por el complejo quinasa de I κ B (IKK) post-estímulo con TNF en células HeLa (Wu et al., 2002). Otro estudio describe que en células fibroblásticas embrionarias de rata deprivadas de suero, RAC3 se halló principalmente en el citoplasma; mientras que al agregar insulina al medio translocó al núcleo. Esta redistribución puede ser bloqueada por el agregado de altas concentraciones de ácido okadaico, que inhibe a las fosfatasas 1 y 2 (Yu et al., 2007). En suma, estas observaciones sugieren que la localización subcelular de RAC3 es regulada por receptores tirosina quinasa asociados a membrana como el receptor de insulina. De acuerdo con esto, también se demostró que el factor de crecimiento epidérmico (EGF) estimula la fosforilación de RAC3 e induce su localización nuclear (Long et al., 2010) .

Del mismo modo, estudios comparativos de la expresión de RAC3 en tejido normal de mama *versus* tejido mamario maligno, encontraron un aumento de la retención nuclear, con una disminución concomitante de RAC3 citoplasmática

cuando el epitelio normal progresa a un fenotipo más tumorigénico (List et al., 2001). Otros trabajos igualmente afirman que la localización subcelular de RAC3 en la glándula mamaria es específica del grado de desarrollo y estado de malignidad (Kuang et al., 2004). También se ha reportado mediante el uso de un modelo de ratón transgénico de epitelio de mama se demostró que RAC3 es citoplasmática en células no proliferativas y nuclear en células en división (Avivar et al., 2006).

1.9- RAC3 un oncogén

Si bien desde su mismo descubrimiento se relacionó la sobre-expresión de RAC3 con tumores de ovario y mama (Anzick et al., 1997), todavía restaba comprender qué contribución hacía en el desarrollo tumoral o si simplemente era una consecuencia del mismo. Resulta interesante remarcar, que en la mayoría de esos tumores la sobreexpresión de RAC3 no se debía a una amplificación génica, sino a un aumento de su expresión.

Como se describe a continuación, existen múltiples evidencias por las cuales actualmente RAC3 es considerado un oncogén, con acciones biológicas tanto en el núcleo celular actuando como coactivador, así como en el citoplasma. Además, veremos que una característica particular de este oncogén que a diferencia de otros, no requiere de una mutación para esta acción biológica (Ma et al., 2011a; Yan et al., 2006).

1.9) A- Modelo de ratones transgénicos de RAC3

El papel oncogénico de RAC3 se determinó mediante la generación y caracterización de ratones transgénicos MMTV–RAC3. Este estudio demostró que la sola sobre-expresión de RAC3 causa la hipertrofia mamaria, hiperplasia anormal, involución post-destete y desarrollo espontáneo de tumores mamarios malignos. El porcentaje de incidencia de tumores no solo se incrementó en mama (48%) sino también en otros órganos como, útero (18%), glándula pituitaria (42%) y pulmón (18%) (Torres-Arzayus et al., 2004). Por otro lado, el 16,7% de los tumores mamarios desarrollados fueron ER negativos. Además, congruente con lo hallado al disminuir los niveles de RAC3 y la consecuente disminución de la vía de

señalización de IGF-1, los ratones a los que se indujo la sobre-expresión de RAC3 poseen la ruta de señalización de IGF-1 hiperactiva.

Trabajos posteriores realizados por el mismo grupo y el mismo modelo de ratón transgénico pero ovariectomizado (ovx) o bien mutante negativo de ER β demuestran que la sobre-expresión ectópica de RAC3 todavía induce tumorigénesis en pulmón, pituitaria, piel y tejido óseo. Asimismo en el grupo de ratones ovx que tiene atenuada la vía de señalización del ER e inhibido el desarrollo de su glándula mamaria, algunos ratones aun desarrollan hiperplasia mamaria y carcinoma ductal (Torres-Arzayus et al., 2004). RAC3 se halló sobre-expresado en tumores de mama, que no poseen ER o PR (Bouras et al., 2001).

Los datos aportados por esta variedad de modelos *in vivo* indican fuertemente que la sobre-expresión de RAC3 dispara la tumorigénesis además por otros mecanismos no dependientes de receptores nucleares o incluso totalmente independientes de ellos.

Paralelamente la depleción de RAC3 suprime significativamente la tumorigénesis mamaria inducida por v-H-ras o el carcinógeno químico 7,12-dimetilbenzo-antraceno (DMBA) (Kuang et al., 2005).

1.9) B- RAC3 se encuentra en altos niveles en una amplia gama de tipos tumorales

❖ *Cáncer de mama*: RAC3 se encuentra sobre-expresado o, en algunos casos, su gen amplificado en tumores de mama [5, 14, 57, 231, 233-241]. Su sobre-expresión correlaciona con patologías como gran tamaño, alto grado tumoral; mal pronóstico de supervivencia global y reincidencia de la enfermedad [57, 231, 236, 237, 239, 240]. En pacientes tratados con tamoxifeno los altos niveles de RAC3 se relacionan con resistencia a la droga y mal pronóstico de supervivencia libre de enfermedad.

Otro caso importante es el de los pacientes con altos niveles de RAC3 y de ERBB2 que exhiben resistencia severa y temprana a la terapia con moduladores selectivos de receptores de estrógeno (SERM) [241]. Además, la fosforilación de RAC3 está aumentada en tumores de mama inducidos ERBB2, de manera que los niveles de fosforilación de RAC3 podrían ser un marcador para evaluar la eficacia de inhibidores de la tirosina quinasa. Se postula que la sobre-expresión del receptor ERBB2 activa la vía de las MAPK quinasas causando la fosforilación de

RAC3 y ER por AKT. La quinasa AKT también puede inhibir a GSK3^[61] (Figura 5), lo que sugiere una retroalimentación positiva entre los niveles de RAC3 y la actividad de AKT.

Existen numerosos estudios del rol de RAC3 en cáncer de mama en modelos de ratones *in vivo*:

1) En modelos de ratones MMTV-*v-ras* (RAS), la incidencia de tumores de mama se redujo drásticamente en ratones vírgenes RAC3^{-/-}; *ras* e inhibió completamente en ratones ovx RAC3^{-/-}; *ras* (Kuang et al., 2004). La deficiencia de RAC3 no alteró la expresión de genes dependientes de estrógeno y progesterona en la glándula mamaria y tumores, pero causó resistencia parcial al factor de crecimiento insulina-*like* I (IGF-1) disminuyendo significativamente la expresión del receptor IRS-1 y el IRS-2. La disminución de ésta vía puede ser una de las causas de la represión de la tumorigénesis mamaria y la metástasis en estos ratones. 2) En otro modelo se caracterizó el rol de RAC3 en la susceptibilidad de la glándula mamaria a carcinógenos químicos (Kuang et al., 2005). Estos estudios sugieren que el rol de RAC3 en el crecimiento ductal de mama es independiente de las células epiteliales mamarias. En ratones tratados con el carcinógeno químico DMBA, la deficiencia de RAC3 protegió a la glándula mamaria de la tumorigénesis pero no a la piel, y en este caso nuevamente la falta de RAC3 disminuyó la disponibilidad de los receptores IRS-1 e IRS-2 y por lo tanto inhibió la activación de AKT, disminuyó la expresión de Ciclina D1 y la proliferación celular. 3) En un tercer modelo, se estudió el rol de RAC3 en la tumorigénesis mamaria inducida por MMTV-ERBB2 en ratones RAC3^{-/-} (Fereshteh et al., 2008). Este estudio mostró que el desarrollo de tumores mamarios inducidos ERBB2 se retrasó considerablemente en ratones RAC3^{+/-} y fue completamente suprimido en ratones RAC3^{-/-}. En comparación con el control; los tumores ERBB2, RAC3^{+/-} mostraron la disminución en ERBB2 fosforilada, Ciclina D1 y Ciclina E. También se observó la reducción de la actividad de AKT y JNK, y disminución en la proliferación celular.

Estos hallazgos sugieren fuertemente que RAC3 es requerido para la actividad oncogénica ERBB2.

4) En un cuarto modelo se evaluó el papel de RAC3 en la metástasis de tumores de mama mediante el uso de ratones MMTV-PyMT (Qin et al., 2008). La ablación genética de RAC3 en estos ratones MMTV-PyMT redujo significativamente la metástasis de pulmón.

❖ *Cáncer de próstata*: La sobre-expresión proteica de RAC3 en cáncer de próstata se relacionó con un alto grado y estado tumoral, corta supervivencia y recurrencia de PSA (antígeno prostático específico), activación de AKT y proliferación tumoral.

En células de cáncer de próstata, RAC3 activa la vía AKT/mTOR y estimula el crecimiento celular aumentando el tamaño celular. La disminución de los niveles de RAC3 restringe la proliferación de células tumorales y el crecimiento del tumor xenotrasplantado en ratones *nude* e incrementa la apoptosis (Zhou et al., 2003; Zhou et al., 2005).

El rol de RAC3 en cáncer espontáneo de próstata se investigó utilizando el modelo de ratones TRAMP *versus* TRAMP/RAC3^{-/-} (Chung et al., 2007). Los resultados indicaron que la inducción *de novo* de la expresión de RAC3 en células epiteliales parcialmente transformadas es fundamental para progresión de la tumorigénesis de próstata a un carcinoma de células poco diferenciadas.

❖ *Cáncer de ovario*: RAC3 se encuentra sobre-expresada y en algunos casos su gen amplificado y correlaciona con la corta supervivencia libre de enfermedad y alto grado tumoral (Anzick et al., 1997).

❖ *Cáncer de endometrio*: los niveles de ARNm de RAC3 se hallaron sobre-expresados con una frecuencia de 17% y sorprendentemente su proteína se encontró sobre-expresada en un 93% de los casos, y esto correlacionó con un alto grado y estadio tumoral y corta supervivencia (Sakaguchi et al., 2007).

Más recientemente se encontró a RAC3 sobre-expresado en muchos tipos de tumores no dependientes de hormonas esteroideas, de hecho nuestro grupo ha planteado esta hipótesis desde el descubrimiento de su interacción con NF- κ B en el año 2000 (Werbajh et al., 2000). Estos hallazgos inducían a sospechar que RAC3 podría contribuir en el desarrollo tumoral independientemente de hormonas esteroideas o NRs. Además, como hemos mencionado en algunos tumores mamarios la tumorigénesis no involucra necesariamente a receptores esteroideos, e incluso se reportaron casos de tumores de mama con alto RAC3 y ER negativos. Más aún, hemos demostrado que en tumores de mama respondedores a estrógenos y con elevada expresión de RAC3, la vía más importante por la cual esta molécula contribuye a tumorigénesis no es justamente coactivando a ER, sino que los estrógenos requieren de su asociación a NF- κ B en complejos conteniendo RAC3 (Rubio et al., 2006).

Tabla 4: Niveles de RAC3 en tumores hormono respondedores

cáncer hormono-dependientes	Cambios	Frecuencia	Asociación patológica y pronóstico
	Cáncer de mama		
	Amplificación génica	1.6-9.5%	Gran tamaño tumoral
	Sobre-expresión de ARNm	13-64%	Alto grado tumoral, corta SLE and SG
	Sobre-expresión proteica	16-53%	Alto grado tumoral, corta SLE , corta SG , larga SLE
	Cáncer de próstata		
	Sobre-expresión proteica	13.1-37.9%	Alto grado tumoral, estadio corto de SEE , PSA recurrencia
	Cáncer de ovario		
	Amplificación génica	7.4-25.8%	Corta SLE
	Sobre-expresión proteica	64% de los tumores de alto grado	Alto grado tumoral
	Cáncer de endometrio		
	Sobre-expresión de ARNm	17%	Alto grado y estadio tumoral, corta supervivencia (24 meses)
	Expresión proteica	93%	Alto grado tumoral
	Cáncer de células escamosas de esófago (ESCC)		
	Amplificación génica	4.9-13%	ND
	Sobre-expresión proteica	46-64.3%	Alto grado tumoral. Corta SLP y SEE

Tabla 5. Niveles de expresión y/o amplificación en tumores hormono-dependientes SLE, supervivencia libre de enfermedad; SG, supervivencia global; ND, no determinado; HCC, cáncer hepatocelular; ESCC, cáncer de células escamosas de esófago; NSCLC, cáncer de pulmón de células no pequeñas. Adaptado de Gang Ma, et. al, 2011].

Como muestra la tabla 5, RAC3 se halló sobre-expresado o amplificado en muchos tipos tumorales hormono-independientes como páncreas (Henke et al., 2004), esófago (ESCC) (Yu et al., 2007), pulmón (NSCLC) (Cai et al., 2007), gástrico (Sakakura et al., 2000), carcinoma colorectal (Xie et al., 2005), vejiga (Dolecek et al., 2008) entre otros].

De hecho, los niveles de RAC3 están asociados a la metástasis y la recurrencia del tumor en el cáncer gástrico (Sakakura et al., 2000) y hepatocelular (Wang et al., 2002). Tomando estos datos clínicos se puede afirmar que RAC3 tiene un rol importante en la tumorigénesis y el desarrollo tumoral en algunos casos independientemente de sus funciones como coactivador de receptores nucleare

Tabla 5: Niveles de RAC3 en tumores hormono independientes

CÁNCER HORMONO INDEPENDIENTES	Cambios	Frecuencia	Asociación patológica y pronóstico
	Cáncer colorectal		
	Amplificación génica	10-32%	ND
	Sobre-expresión proteica	35-56.5%	Alto grado tumoral. Larga SG
	Cáncer hepatocelular (HCC)		
	Amplificación génica	41% de metastásicos HCC; 60% de recurrentes HCC	ND
	Sobre-expresión proteica	67.6%	ND
	Cáncer pancreático		
	Amplificación génica	37%	ND
	Sobre-expresión de ARNm	73.68%	ND
	Sobre-expresión proteica	64.47%	ND
	Cáncer gástrico		
	Amplificación génica	41% (7% alto nivel de amplificación; 34% bajo nivel de amplificación)	Alta metástasis linfática regional, alto grado y estado tumoral, mal pronóstico
	Sobre-expresión de ARNm	40%	ND
	Cáncer de vejiga		
	Amplificación génica	7.0%	ND
	Sobre-expresión proteica	32.5%	Corta supervivencia
	Cáncer nasofaríngeo		
	Amplificación génica	7%	ND
	Sobre-expresión proteica	51%	Alta metástasis linfática y estado tumoral

Tabla 5. Niveles de expresión y/o amplificación en tumores hormono-independientes SLE, supervivencia libre de enfermedad; SG, supervivencia global; ND, no determinado; HCC, cáncer hepatocelular; ESCC, cáncer de células escamosas de esófago; NSCLC, cáncer de pulmón de células no pequeñas. Adaptado de Gang Ma, et. al, 2011.

Si bien, RAC3 se encuentra sobre-expresado en una gran variedad de tumores, en general no se debe a amplificación génica, sino que su expresión se encuentra descontrolada. A través de experimentos in vivo donde inyectamos ratones BALC con LPS, hemos demostrado que la expresión de RAC3 puede ser modulada por la respuesta inflamatoria. En este trabajo demostramos además que la expresión de RAC3 es regulada por la citoquina inflamatoria TNF y que la actividad del factor de transcripción NF- κ B es indispensable para esta respuesta (Alvarado et al., 2014).

Demostramos además que la expresión de RAC3 es regulada negativamente por la hipoxia (Fernandez Larrosa et al., 2012) y durante el proceso de envejecimiento (Fernandez Larrosa et al., 2015)

1.10- Rol de RAC3 en el desarrollo tumoral

Ciertas células tumorales adquieren la capacidad de sostener la señalización proliferativa de múltiples maneras: 1) Produciendo ligandos propios a factores de crecimiento (estimulación autócrina); 2) Enviando señales a las células estromales del soporte tumoral estimulándolas a liberar factores de crecimiento; 3) Elevando los niveles de receptor en su superficie, volviéndose hipersensibles a factores de crecimiento. 4) Modificando la estructura de los receptores para activarse independiente del ligando 5) Adquiriendo la independencia de factores de crecimiento por la activación constitutiva de los componentes de las vías de señalización río abajo a los receptores.

Las ventajas que otorga a las células tumorales activar señales río arriba (receptores) *versus* río abajo (transductores) no están claras, como tampoco el entrecruzamiento entre las múltiples vías que se desprenden de los receptores de factores de crecimiento.

Existen evidencias que muestran que RAC3 es requerido por el factor de crecimiento dependiente de insulina (IGF-1) para la proliferación, supervivencia, señalización y expresión de genes en tumores mamarios (Torres-Arzayus et al., 2004). Además RAC3 es capaz de regular la transcripción de IGF/AKT, uniéndose a los promotores de IRS-2 o IGF-1 a través de AP-1 (Yan et al., 2006).

1.10)A- RAC3, ciclo celular y supresores tumorales

Como detallamos al comienzo de la introducción en condiciones normales el ciclo celular se encuentra finamente regulado, sin embargo, en condiciones patológicas como el cáncer la pérdida de actividad de proteínas que regulan el ciclo celular llevan a un aumento descontrolado de la proliferación. Hacemos un repaso esquemático del ciclo celular en la Figura 20

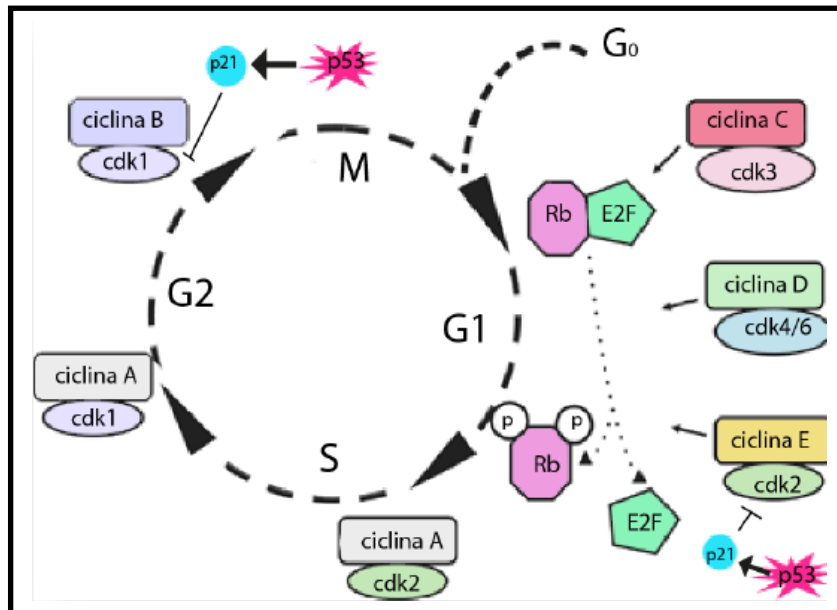


Figura 20. Esquema representativo de las diferentes fases del ciclo celular. Cdk: quinasas dependientes de Ciclina; Rb: retinoblastoma, Fases: S, síntesis, M, mitosis; G0, G1, G2: “Gap” 0, 1 y 2.

RAC3 puede afectar el control del ciclo celular a través de la activación de la vía de AKT, inhibiendo la expresión del inhibidor del ciclo celular p21Cip1/Waf1 en células de HCC (Xu et al., 2010). Trabajos realizados con la línea celular de cáncer de mama T47D demuestran que la sobre-expresión de RAC3 mantiene a las células en fase S al tratarlas con el antagonista de estrógenos *fulvestrant* (Louie et al., 2004) y en concordancia con éstos la disminución de RAC3 con RAC3-RNAi disminuyó el número de células en fase S y aumentó el número de células en G1 en fibroblastos de pulmón embrionario humano y la línea celular HCC (Xu et al., 2010).

Además se ha reportado que la translocación de RAC3 al núcleo coincide con la transición G1/S en células tumorales (Louie et al., 2006). Más aún en un modelo *in vivo* de cáncer de tiroides inducido TR- β en ratón, la depleción de RAC3 aumentó significativamente las células en fase G1/G0 y disminuyó las células en la fase G2/M.

A su vez como mencionamos anteriormente, RAC3 es coactivador de E2F asociado a la transición G1/S y síntesis del ADN (Louie et al., 2006).

Estas evidencias en conjunto muestran que la desregulación de RAC3 puede perturbar la progresión del ciclo celular normal y promover la iniciación del cáncer y la proliferación descontrolada.

1.10) B- Resistencia a la muerte celular: RAC3 protege de la apoptosis

Como se explicó al comienzo de esta introducción, la apoptosis o muerte celular programada es un proceso finamente regulado que involucra cambios morfológicos característicos como encogimiento celular, fragmentación del ADN y formación de cuerpos apoptóticos, que finalmente son fagocitados sin que se desate una respuesta inflamatoria.

Entre los estímulos que inducen la apoptosis se encuentran elevados niveles de señalización de un determinado oncogén y el daño al ADN asociado a la hiperproliferación.

Es sabido que la apoptosis actúa como una barrera natural para el desarrollo tumoral (Ouyang et al., 2012), sin embargo algunos tumores escapan o disminuyen la apoptosis avanzando a estados de alto grado de malignidad y resisten la terapia (Ouyang et al., 2012).

En relación al rol de RAC3 en la apoptosis nuestro grupo ha demostrado por primera vez, que su sobre-expresión en la línea no tumoral humana de riñón embrionaria HEK293, es capaz de evitar tanto la apoptosis inducida por la vía extrínseca como por la vía intrínseca. El modelo propuesto es el aumento de la actividad transcripcional de NF- κ B y llamativamente por un mecanismo no genómico que involucra la disminución de la actividad de Caspasa 9, el aumento en la actividad de AKT y p38, la inhibición de ERK2 y de la translocación del factor apoptótico AIF (Factor inductor de apoptosis 1) al núcleo que queda retenido en el citoplasma (Colo et al., 2008).

Posteriormente también demostramos que células leucémicas humanas: K562 con altos niveles de RAC3 e insensibles al tratamiento anti-tumoral con *flavopiridol* o TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), son sensibilizadas al mismo con la sola disminución de sus niveles de expresión mediante RAC3-RNAi, que además provoca la disminución de la actividad NF- κ B y subsiguiente muerte celular (Colo et al., 2007).

Otros grupos también han demostrado la relación de altos niveles de expresión de RAC3 con la disminución en los niveles de expresión del inhibidor de la apoptosis Bcl-2 en la línea de cáncer de próstata PC3 (Zhou et al., 2005) [246] y el incremento en los niveles de Caspasa 7 clivada (activa) en la línea celular metastásica de células no pequeñas de cáncer de pulmón NSCLC H1299 (Zhou et al., 2005). Posteriormente, también se ha demostrado que la disminución en los

niveles de RAC3 en células linfoides Jurkat inhibe la expresión de los genes anti-apoptóticos blanco de NF- κ B (Ma et al., 2011a).

Por otra parte se ha descrito que RAC3 puede proteger de la apoptosis a través de la vía de AKT (Torres-Arzayus et al., 2004). En éste contexto hemos demostrado que la protección de la apoptosis al sobre-expresar RAC3 involucra también la activación de la vía de AKT (Colo et al., 2008).

El proceso autofágico también es considerado un supresor tumoral durante las etapas tempranas de la progresión tumoral o como protector tumoral en etapas tardías donde el tumor experimenta, condiciones hipóxicas y de falta de nutrientes. Con respecto a ello nosotros encontramos que la sobreexpresión de RAC3 inhibe la autofagia cuando es inducida por deficiencia de nutrientes en el medio o estrés metabólico con Rapamicina lo cual involucra mecanismos dependientes o no de la translocación de RAC3 a núcleo. Más aún, encontramos que la hipoxia inhibe la expresión de RAC3 permitiendo el proceso autofágico, permitiendo que las células tumorales sobrevivan hasta que la angiogénesis ocurre (Fernandez Larrosa et al., 2012).

2- RAC3 y el mantenimiento de características Stem Cell

Se sabe que las células madre embrionarias, tienen la capacidad de diferenciarse a todos los linajes generando todos los tejidos, tienen además la capacidad de autoperpetuarse y de proliferar de modo indefinido, dado que, al igual que en tumores mantienen activa la telomerasa preservando al genoma de daños y errores en los ciclos de división celular sucesivos (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Russell and Kahn, 2007).

En el desarrollo se establece un orden jerárquico de diferenciación a distintos linajes por el cual, si bien se desarrollan los distintos tejidos, paralelamente, se generan células madre en un orden jerárquico desde pluripotente a subpoblaciones con una capacidad de diferenciarse a distintos tejidos cada vez más restringida y la capacidad de autorenovación limitada. Existen células madre en todos los tejidos como fuente de renovación tisular, aunque el contenido es escaso y su potencial para diferenciar a tejidos específicos para uso en terapias en humanos es restringido y la utilización de células madre provenientes de embriones, totipotentes, impracticable por lógicos principios éticos. En este sentido, el descubrimiento de que células

diferenciadas pueden transformarse a un fenotipo más indiferenciado a través de una modificación genética incorporando solo 4 genes, constituyó una verdadera revolución (Okita et al., 2007). Estas células transformadas, además de adquirir la capacidad de diferenciarse a distintos linajes readquieren la capacidad de autoperpetuarse y aparentemente, muestran un patrón de cambios epigenómicos muy similar a las células embrionarias, si bien, esto ha sido recientemente cuestionado (Liang and Zhang, 2013).

A fines del año 2012, se demuestra que RAC3 es un factor necesario para mantener el estado pluripotente y la autorrenovación de células madre (Percharde and Azuara, 2012; Percharde et al., 2012). Más aún, en otro trabajo publicado en este año, se demuestra que RAC3 se encuentra en altos niveles en células madre embrionarias de ratón y sus niveles bajan en el proceso de diferenciación. Por otro lado, la inhibición de la expresión del gen RAC3 por transfección de líneas de células madre de ratón con un siRNA para RAC3 inhibe la expresión de Nanog y otros genes relacionados con el mantenimiento del fenotipo de célula madre como Tbx3, Klf4, and Dax-1. Además, la expresión de RAC3 es regulada por Nanog en forma directa, dado que contiene etiquetas en su promotor para la unión de este factor (Chitilian et al., 2014).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

De acuerdo con los contenidos de la introducción, brevemente, pueden resumirse los siguientes conceptos:

RAC3 es un coactivador originalmente descrito como específico de receptores de hormonas esteroideas, con actividad acetilasa de histonas y la capacidad de remodelar la cromatina facilitando la expresión de genes blanco de estas hormonas. Se lo encontró sobre-expresado en tumores dependientes de las mismas y por esta razón se lo asoció a tumorigénesis hormono-dependiente. Sin embargo, años más tarde, nuestro grupo y otros investigadores hemos demostrado que RAC3 es un coactivador para otros factores de transcripción y tiene además otras funciones a nivel citoplasmático por las cuales contribuye al desarrollo tumoral de una gran variedad de tumores dependientes o no de hormonas, por las cuales hoy día se define como un oncogén.

A diferencia de otros oncogenes conocidos, en el caso de RAC3, su rol oncogénico no depende de la expresión de variantes por mutación, sino que, la sola sobreexpresión es suficiente. Consecuentemente, su expresión en células normales, no tumorales, es limitante y en ocasiones indetectable por técnicas habituales de determinación de proteínas.

Hemos demostrado previamente que RAC3 es un coactivador de NF- κ B, aumentando su actividad transcripcional, así como la expresión de algunos de sus genes blanco que contribuyen a la tumorigénesis. También demostramos que su sobreexpresión contribuye al desarrollo tumoral inhibiendo la apoptosis inducida por vía de membrana y mitocondrial, en células tumorales y no tumorales, utilizando mecanismos moleculares tanto de acción nuclear como citoplasmática. También hemos demostrado que la sobreexpresión de este coactivador inhibe la autofagia, pero la hipoxia inhibe su expresión, generando un ambiente permisivo para la supervivencia de la célula tumoral en condiciones de ayuno e hipoxia, previo al inicio de la angiogénesis. Ratones transgénicos en los que la expresión de RAC3 ha sido anulada muestran un retraso madurativo y múltiples afectaciones en aparatos y sistemas. Aquellos en los que RAC3 se encuentra sobre-expresado desarrollan múltiples tumores.

A pesar de que la sobreexpresión de esta molécula es clave para todos estos procesos y que se encuentra en múltiples tumores, en la mayoría de los casos no se debe a amplificación génica y los mecanismos que controlan su expresión no habían sido completamente esclarecidos. Sin embargo, recientemente, hemos demostrado que la respuesta inflamatoria aumenta la transcripción del gen de RAC3 tanto *in vivo*

como *in vitro*, sugiriendo que el microambiente inflamatorio tumoral podría contribuir en la regulación de su actividad oncogénica.

Tres trabajos recientes de otros investigadores demuestran que RAC3 es un factor necesario para mantener el estado pluripotente y está directamente involucrado en el control de la expresión del gen Nanog, uno de los 4 genes necesarios para la reprogramación genética de células maduras y producción de células pluripotentes inducidas (iPSC).

Resulta interesante destacar que precisamente, las células madre tumorales, además de la capacidad de regenerar el tumor y autoperpetuarse, son más resistentes a la inducción de apoptosis y no muestran senescencia replicativa.

Integrando todos estos conocimientos, podría suponerse, que los altos niveles de RAC3 podrían contribuir al mantenimiento de estas características de las células madre.

Por otro lado, en caso que las stem tumorales pudieran derivar de stem normales, también podría interpretarse que el mantenimiento de altos niveles de RAC3 tiene un rol transformante y oncogénico, favoreciendo la expansión clonal asimétrica a partir de células madre que han sufrido mutaciones y/o cambios epigenómicos. Esta podría ser la razón por la cual se lo encuentra elevado en tan variado tipo de tumores.

Concretamente, todos los efectos biológicos descritos y por los cuales RAC3 contribuye a la oncogénesis, podrían ser consecuencia de que su sobreexpresión en células no tumorales genera células tipo células madre tumorales, más resistentes a la apoptosis, senescencia, mayor tasa proliferativa y con la capacidad de adquirir movilidad e invasividad. Las citoquinas inflamatorias podrían estar contribuyendo a estas acciones a través del aumento en la expresión de RAC3 y la regulación de su actividad biológica.

Se plantean entonces las siguientes hipótesis:

Hipótesis

-La sobreexpresión de RAC3 tiene un rol transformante, favoreciendo el aumento, preservación o inducción de células iniciadoras de tumores que presentan mayor motilidad e invasividad y, por lo tanto, serían las responsables de las metástasis y persistencia de la enfermedad.

-Las señales inflamatorias contribuyen a una o varias de estas acciones biológicas inducidas por sobreexpresión de RAC3.

Para confirmar estas hipótesis, se proponen los siguientes objetivos:

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo de tesis fue determinar si el aumento en la expresión de RAC3 en células no tumorales podía inducir transformación tumoral con adquisición de un fenotipo de célula madre tumoral y en qué medida las señales inflamatorias podrían contribuir a esta acción oncogénica.

Objetivos específicos

1- Determinar si la sobreexpresión de RAC3 por transfección de células no tumorales, induce transformación una transformación tumoral, con adquisición de características de célula madre tumoral

a-Determinar si una sobreexpresión de RAC3 en células no tumorales es capaz de aumentar su proliferación, incluso, en ausencia de factores de crecimiento.

b-Determinar si la sobreexpresión de RAC3 en una línea celular está asociada a un aumento de marcadores de stem cell tumorales como CD44.

c-Determinar si el aumento en los niveles de expresión de RAC3 en células no tumorales favorece el crecimiento de tumor-esferas y crecimiento clonogénico.

d-Determinar si la sobreexpresión de RAC3 correlaciona con un aumento en la actividad de MDR.

2-Determinar si la sobreexpresión de RAC3 promueve un fenotipo migratorio e invasivo en células originalmente no tumorales

a-Determinar si la sobreexpresión de RAC3 favorece la formación de esferoides.

b-Investigar si existen cambios de contacto célula-célula y de contacto célula-matriz extracelular.

c-Determinar si la sobreexpresión de RAC3 promueve o induce la migración celular e invasión.

b-Determinar si la adquisición de motilidad es compatible con los cambios necesarios en el patrón de expresión y localización de proteínas involucradas en el contacto célula-célula y célula-matriz extracelular.

c-Determinar si la adquisición de invasividad está asociada a la inducción de síntesis de metaloproteasas (2 y 9).

3- Determinar si la sobreexpresión de RAC3 tiene algún efecto sobre la senescencia celular

a-Determinar si la sobreexpresión de RAC3 protege de la senescencia prematura inducida por estrés genotóxico o metabólico.

b-Determinar si la expresión de RAC3 es necesaria para el mantenimiento de la actividad telomerasa en células tumorales.

c- Determinar si las células originalmente no tumorales, transformadas por sobreexpresión de RAC3, son capaces de inducir tumores in vivo al ser inoculadas en ratones.

4-Determinar si el estímulo con TNF potencia o modifica acciones biológicas inducidas por sobreexpresión de RAC3

a-Determinar si las propiedades adquiridas por sobreexpresión de RAC3 pueden ser potenciadas por el estímulo con TNF.

b-Investigar las posibles cascadas de transducción de señal que podrían estar involucradas en estas acciones biológicas.

3.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- Modelo experimental

El desarrollo de los objetivos propuestos requiere de:

- A- estudios *in vitro* en líneas celulares
- B- estudios *in vivo* por inoculación de ratones nude con células modificadas por transfección

A- Para los estudios *in vitro* se requiere de células que cumplan con los siguientes requisitos:

- Deben ser de origen humano, dado que se investiga a una molécula humana.
- Deben ser no oncogénicas y por lo tanto, de baja o indetectable expresión de RAC3 y la consiguiente baja o absoluta incapacidad de migrar, invadir, crecer independientes de anclaje, formar esferoides.
- Deben ser incapaces de desarrollar senescencia replicativa: los controles de baja expresión deben poder perpetuarse en cultivo en el transcurso de todo el desarrollo del plan de trabajo sin grandes cambios o selección poblacional.
- Todos estos requisitos los cumple una línea celular y NO, un cultivo primario.

Por tratarse de una línea celular, en todos los casos, la capacidad de proliferación indefinida estará asociada a una transformación, por ejemplo, por expresión de proteínas virales y esto es inevitable. Sin embargo, resulta importante que en su genotipo poblacional carezca de las mutaciones adicionales de oncogenes clásicos y ubicuas como por ejemplo, supresores de ciclo (p53, p21, Rb), que predisponen a transformación oncológica.

Para este trabajo de tesis se utilizaron las células de riñón embrionario humano (HEK293), que cumplen con todos estos requisitos y además presentan ventajas adicionales:

- son de origen embrionario y si bien han sido modificadas por la expresión de proteínas de adenovirus y carecen de un potencial pluripotente, tampoco presentan un fenotipo altamente diferenciado, facilitando quizás la comprobación de las hipótesis planteadas: la transformación y adquisición de características stem desde células menos diferenciadas debería ser menos compleja que partiendo de líneas altamente diferenciadas.
- se transfectan con alta eficiencia por métodos económicos.

Para el desarrollo de todos los experimentos se utilizaron clones de expresión estable obtenidos por selección a partir de la transfección con un vector de expresión estable de RAC3, bajo el control de promotor fuerte constitutivo pCMV-tag2B-RAC3.

La línea, cultivos de expresión transciente, cultivos policlonales, han sido utilizadas previamente en otros trabajos del grupo y sus niveles pueden ser fácilmente confirmados por qPCR y western blot.

Tanto en el proceso de selección, como en el mantenimiento de clones, los cultivos de amplificación y mantenimiento se realizaron en presencia de antibiótico de selección G418. Los experimentos se realizaron en ausencia del antibiótico.

Se utilizaron como control células tipo salvaje y transfectadas de forma estable con vector vacío, policlonales, cultivadas bajo la misma presión selectiva.

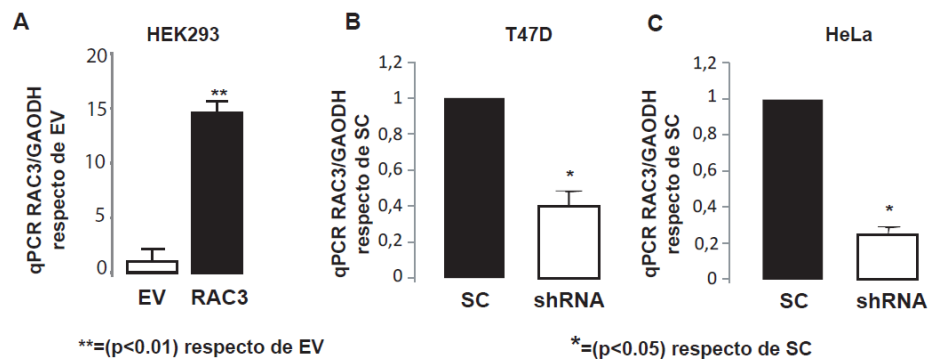
Líneas celulares tumorales:

En algunos experimentos utilizamos líneas celulares tumorales humanas como controles positivos de alta expresión de RAC3.

Como mencionamos en la construcción de la hipótesis lo que se intenta en el presente trabajo es evaluar el efecto de sobreexpresión de RAC3 como un evento temprano en la ontogenia tumoral y por lo tanto no sería conveniente restringirlo a un único tipo tumoral. Por tal motivo, el tipo tumoral del que derivan las líneas celulares tumorales utilizadas, no es restrictivo para los fines de este trabajo. Hay que considerar también, que todas las líneas tumorales establecidas además de sobreexpresar RAC3 presentan mutaciones e hiperactivación de rutas que podrían resultar en efectos que no se deben sólo a la sobreexpresión de RAC3.

Se utilizaron las células de tumor mamario humano T47D (ER+ PR+, poco metastásicas) y células de tumor de cuello de útero humano HeLa, transfectadas con vector de expresión constitutiva para un shRNA-RAC3 o vector con inserto scrambled como control, a partir de los cuales se obtuvieron cultivos policlonales seleccionados en presencia de puromicina a bajo número de pasajes. Según experiencia previa del laboratorio, la inhibición sostenida de la expresión de RAC3 en cultivo a largo plazo induce senescencia en la línea celular HeLa y pérdida de la línea T47D.

Los niveles de expresión de RAC3 fueron chequeados periódicamente qPCR.



Un aspecto importante a destacar en todos los casos, para todas las líneas utilizadas es que presentan receptores para TNF pero no constituyen un blanco de necrosis o apoptosis para la citoquina. Las T47D, por ejemplo, responden con aumento de la proliferación por estímulo con TNF.

B- Animales

Por tratarse de líneas celulares humanas, para el desarrollo de los experimentos *in vivo* se utilizaron ratones nu/nu de 7 a 10 semanas de edad que fueron mantenidos en condiciones de esterilidad y alojados en *racks* ventilados, tal como se describe más adelante.

3.2- Metodología utilizada para los experimentos con estímulo inflamatorio

En este trabajo utilizamos una dosis de TNF 20ng/ml como estímulo inflamatorio y como control negativo se utilizó Sz 250μM (inhibidor de la actividad IKK) ambas concentraciones ya han sido utilizadas en varios trabajos publicados en nuestro laboratorio y a partir de los cuales sabemos que dichas dosis no generan apoptosis en las líneas celulares utilizadas (Alvarado et al., 2014; Rubio et al., 2012; Rubio et al., 2006; Werbajh et al., 2000).

Para resumir, en los experimentos donde se utilizó TNF, las células con sobreexpresión o no de RAC3 fueron cultivadas en sus respectivos medios de cultivo y fueron tratadas con 4 condiciones distintas: i) Sin estímulo (Basal); II) TNF 20ng/ml (TNF); III) Sz 250μM (Sz); IV) TNF 20ng/ml+ Sz 250μM (TNF+Sz). Con el fin de garantizar la inhibición de IKK previo al estímulo, la adición de Sz se realizó 30 minutos antes de la adición de TNF.

Principales reactivos empleados como estímulo o tratamiento en los experimentos en cultivo

Reactivo	Origen	Concentración
TNF	Preprotech	10 a 20 ng/ml
Sz	IVAX	250 μ M
Rapamicina	Sigma	50 nM
H₂O₂	Sigma	150 μ M

3.3- Mantenimiento de las líneas celulares

Línea celular	Tipo	Características	expresión endógena de RAC3
HEK293	Epitelial embrionaria	No tumoral	Baja
T47D	Epitelial	Cáncer ductal	Sobreexpresión
HeLa	Epitelial	Cancer de cuello uterino	Sobreexpresión

Las células HEK293 se mantuvieron en medio esencial mínimo modificado de *Dulbecco* (DMEM) alta glucosa (*GIBCO Laboratories, Grand Island, NY, USA*) en presencia de G418. Las líneas T47D y HeLa se mantuvieron con medio esencial mínimo *Dulbecco* modificado con medio *Eagle* F12 (DMEM/F12) en presencia de puromicina (*Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA*). Todas las líneas celulares se mantuvieron en placas plásticas estériles de 10cm y se repicaron con tripsina (0,25% p/v y 1mM EDTA en PBS) cada 3 días aproximadamente, se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Se suplementó los medios con 10% de suero fetal bovino (previamente deplementado por 30 minutos a 56°C en baño termostático), penicilina (100U/ml), estreptomycin (100 μ g/ml) y Gentamicina (500 μ g/ml).

3.4- Vectores de expresión y plásmidos reporteros

→ **pCMV-2TagB-RAC3**: se usó para los experimentos de sobre-expresión del coactivador RAC3, el gen se encuentra bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV). Como vector vacío control se utilizó el plásmido pCMX (Invitrogen)(Fernandez Larrosa et al., 2012).

→ **shRNA-RAC3**: se trata de una construcción comercializada por Origene. La secuencia de shRNA está clonada en el vector pRV-GFP-puromicina. El vector cuenta con la construcción GFP para poder visualizar la eficiencia de transfección y con resistencia a puromicina para poder seleccionar clones de expresión estable. Como control se utilizó el mismo vector donde se encuentra clonada la secuencia scramble (Fernandez Larrosa et al., 2015).

→ **κ B-Luc**: se utilizó para medir actividad del factor de transcripción NF- κ B, este plásmido reportero contiene etiquetas blanco de κ B río arriba del gen de Luciferasa, ha sido empleado en trabajos del laboratorio ya publicados (Alvarado et al., 2014) .

→ **TOP TCF/ β -Cat-Luc**: Se utilizó para los ensayos de genes reporteros de la actividad β -Catenina (Grumolato et al., 2013).

→ **RSV- β -gal**: se utilizó como control de eficiencia de transfección para la posterior normalización de las unidades relativas de luz (U.R.L) en todos los ensayos reporteros. Se trata del vector de expresión para la proteína β -Galactosidasa que se encuentra bajo el control del promotor de actividad constitutiva del virus de Sarcoma de Rous (RSV), que fue agregado a la mezcla de transfección en mínimas proporciones (Alvarado et al., 2014).

→ **pRC-I κ Bss**: se utilizó en los experimentos donde se inhibió específicamente al factor de transcripción NF- κ B. El vector de expresión contiene la forma mutada de I κ B α en los aminoácidos Ser32 y Ser36 impidiendo su fosforilación y posterior proteólisis, por lo cual permanece unido a NF- κ B bloqueándolo de modo constitutivo. Lo hemos utilizado en publicaciones de trabajos realizados en nuestro laboratorio (Alvarado et al., 2014).

3.5- Transfección de Células en cultivo

3.5) A- Transfección por el método de cloruro de calcio

El método que se utilizó para transfectar células HEK293 fue el de cloruro de calcio, dado que tienen una eficiencia de incorporación de ADN foráneo del 95% en por este

método. Para ello las células fueron crecidas en placas de 6 pocillos a semiconfluencia, el medio fue reemplazado por DMEM sin SFB. Para la mezcla de transfección, 5µl *buffer* fosfato (tubo B) bajo burbujeo constante. La mezcla A + B se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual fue agregado por goteo sobre las células, luego de 5 horas se reemplazó el medio por medio fresco y 48h post transfección se adicionó G418 500 ng/ml con el fin de seleccionar clones de expresión estable.

3.5) B- Transfección utilizando el reactivo *FUGENE HD* (siguiendo las recomendaciones del fabricante).

Se utilizó para transfectar la línea celular T47D y HeLa con el fin de disminuir sus niveles de RAC3 endógenos.

Las células se crecieron en placas de 6 pocillos a semiconfluencia, el medio fue reemplazado por OPTIMEM sin suero ni antibióticos, y fueron transfectadas con una masa total de 1µg de ADN. El medio de transfección fue reemplazado por medio F12 fresco y completo (10 % suero fetal bovino más antibióticos) luego de 4 horas. A las 48h postransfección, con el fin de seleccionar clones de expresión estable, se agregó puromicina 0.5 mg/ml.

- En los ensayos reporteros de la actividad NF-κB las células se sembraron en placa de 24 pocillos, a una confluencia del 70%. A las 24 horas se transfectaron con 200ng de ADN/pocillo (150ng del vector sin inserto, 40ng del vector reportero κB-LUC y 5ng del vector RSV-β-gal). Para el bloqueo de la actividad NF-κB se cotransfección con el vector ικBss (90ng del vector sin inserto, 40ng del vector reportero κB-Luc, 60 ng del vector ικBss y 5ng del vector RSV-β-gal)

-En los ensayos reporteros de la actividad TCF/β-Catenina las células se sembraron en placa de 24 pocillos, a una confluencia del 70%. A las 24 horas se transfectaron con 200ng de ADN/pocillo (60ng de vector vacío, 135ng del vector reportero TOP TCF/β-Cat-LUC y 5ng del vector RSV-β-gal). Para el bloqueo de la actividad NF-κB se cotransfección con el vector ικBss (135ng del vector reportero TOP TCF/β-Cat-LUC, 60 ng del vector ικBss y 5ng del vector RSV-β-gal).

- En los ensayos reporteros de la actividad NF-κB en esferoides las células se sembraron en placa de 6 pocillos, a una confluencia del 70%. A las 24 horas se transfectaron con 2µg de ADN/pocillo (1.5µg del vector sin inserto, 0.4µg del vector reportero κB-LUC y 0.05µg del vector RSV-β-gal). Para el bloqueo de la actividad NF-κB se cotransfección con el vector ικBss (0.95µg del vector sin inserto, 0.4µg del vector reportero κB-Luc, 0.6 µg del vector ικBss y 0.05 µg del vector RSV-β-gal).

3.6- Experimento de proliferación en ausencia de factores de crecimiento

Para estos ensayos células HEK293 con niveles endógenos o con sobreexpresión de RAC3, fueron tratadas con tripsina y 1000 células/pocillo fueron colocadas en placas de 96 pocillos en medio DMEN+10%SFB. Luego de 24 hs, el medio fue reemplazado por medio fresco en 2 condiciones distintas: i) condición normal de cultivo (DMEN+10%SFB) o ii) condición reducida en nutrientes (DMEN+0.1% SFB). La proliferación fue evaluada a tiempos, 24, 48 y 72 hs, tras lo cual las células fueron fijadas, teñidas con cristal violeta. La proliferación se cuantificó por espectrofotometría a 570nm utilizando un espectrofotómetro Multiscan EX de Termofisher.

3.8- Ensayo de exclusión de Hoechst 33342

Para este ensayo se siguió el protocolo descrito por Seigel et.al 2004 con algunas modificaciones. Para ello células HEK293 con niveles endógenos (EV) o con sobreexpresión de RAC3 (RAC3) fueron tratadas con tripsina 0.0625% en PBS por 5 minutos en estufa a 37°C, 5%CO₂. Para este ensayo se utilizaron 5x10⁵ células mantenidas en suspensión a las cuales se le adicionó Hoechst 33342 (Sigma) a una concentración final de 5µg/ml en presencia o no de Verapamilo 50µM (inhibidor selectivo de los canales de eflujo de Hoechst) durante 90 minutos en estufa. Luego fueron centrifugadas 3 minutos a 3000 rpm, lavadas 2 veces con medio DMEN frío resuspendidas en PBS. Una pequeña alícuota de células en PBS fue tomada para la observación del eflujo de Hoechst por microscopía de fluorescencia. La alícuota restante fue centrifugada y resuspendida en buffer de lisis, el contenido de Hoechst fue medido por espectrofotometría a Abs. 340nm y relativizado a la concentración de proteínas presente en el extracto. Se consideró como población stem cell o cáncer stem cell a la fracción de células sensibles al tratamiento con Verapamilo (Seigel and Campbell, 2004).

3.9- Ensayo de formación de colonias

Para este ensayo 200, 400 u 800 células/pocillo de células HEK293 transfectadas con el vector de expresión de RAC3 o con el vector vacío fueron

colocadas en placas de 6 posillos, en medio DMEN completo. Luego de 7 días post repique las colonias fueron teñidas con cristal violeta y contadas.

3.10- Ensayo de formación de tumor-esferas

Para este ensayo 5×10^4 células/posillo de células HEK293 con niveles endógenos (EV) o con sobreexpresión de RAC3 (RAC3) fueron colocadas en placas de 6 posillos, impregnadas con 1% agarosa para evitar la adherencia, en 2ml de medio DMEN suplementado con 2.5% SFB, 5% gelatina, G418 500ng/ml y 1X estreptomicina/penicilina y mantenidas en estufa a 37°C 5% CO₂. Cada 3 días, se agregó 1ml de medio fresco. Para este experimento se utiliza un número bajo de células con el fin de asegurarse que la formación de esferas no se debe a la agregación de células, con lo cual se puede considerar que cada tumor-esfera se forma a partir de una única célula en suspensión. La formación de tumor-esferas en suspensión fue evaluada periódicamente hasta el día 15 en cultivo.

3.11- Formación de esferoides

Para este ensayo, células HEK293 con niveles endógenos (EV) o con sobreexpresión de RAC3 (RAC3), fueron tratadas con tripsina y 2×10^5 cel. /posillo fueron colocadas en placas de 24 posillos, impregnadas con 1% agar/PBS, para evitar la adherencia, en medio DMEN en ausencia de SFB. Las células fueron cultivadas en estufa a 37°C, 5% CO₂ por 24 hs, tras lo cual, la formación de agregados multicelulares (esferoides) fue observada por microscopio invertido y fotografiadas a una magnitud 40X. El tamaño de los esferoides fue determinado a partir del diámetro promedio de cada uno, utilizando el programa ImageJ, el diámetro promedio se calculó a partir del trazado de 2 líneas perpendiculares cruzando el centro del esferoide, el número de píxeles por línea fue determinado utilizando el comando de medida del programa.

3.12- Adhesión dependiente de E-Cadherina

Para este ensayo células HEK293 con niveles endógenos (EV) o con sobreexpresión de RAC3 (RAC3), fueron tratadas con tripsina 0.01% + Ca⁺⁺ 1mM en

ausencia de EDTA, esta solución degrada selectivamente las integrinas dejando intactas las Cadherinas y a su vez estas se mantienen activas por la presencia de Ca^{++} y la ausencia de EDTA. Luego, 1×10^5 células fueron colocadas en placa de 24 posillos impregnados con 1% agar para evitar la adherencia celular al plástico, en 3 condiciones distintas: I) Medio $+\text{Ca}^{++} 2\text{mM}$ (control de adhesión dependiente de Cadherinas); II) Medio+EDTA1mM (control negativo de adhesión); II) Medio+anti/E-Cadherina 0.2 $\mu\text{g/ml}$ (este anticuerpo se une al dominio extracelular de E-Cadherina bloqueándolo). Las células fueron colocadas en un agitador a 120 RPM a 37°C durante 2 hs. La capacidad de agregación fue evaluada por microscopía y fotografiada a una magnitud 40X.

3.13- Ensayo de adhesión

Para este ensayo células HEK293 con niveles endógenos (EV) o con sobreexpresión de RAC3 (RAC3), fueron tratadas con tripsina y colocadas en placas de 24 posillos, en medio DMEN sin SFB, las células fueron cultivadas en estufa a 37°C 5%CO₂. Luego de 2 hs se retiró por succión del medio de cultivo las células no adheridas. Las células adheridas fueron fijadas, teñidas con cristal violeta y contadas en microscopio óptico a una magnitud 200X.

3.14- Ensayo de migración/invasión por la técnica de *transwell*

La capacidad de migración de células HEK293 transfectadas con el vector de expresión de RAC3 o con el vector vacío fue medida por la técnica de transwell. Para ello se colocaron 5×10^4 células en la parte superior del *transwell* con poro de 8 μm en 100 μl de medio DMEN+0.01%BSA en ausencia de SFB, en la parte inferior se colocó medio DMEN con 10%SFB como quimioattractante. Las células fueron cultivadas en estufa a 37°C 5%CO₂ durante 16 hs, tras lo cual, las células que no migraron fueron retiradas con un hisopo y las que lograron migrar a través de la membrana fueron fijadas con formaldehído 1X, teñidas con *gelred* y contadas en microscopio de fluorescencia.

Para el ensayo de invasión se procedió de la misma manera, pero con el agregado de Matrigel a modo de mimetizar la matriz extracelular. Para estos experimentos se utilizó también la línea celular T47D transfectadas con vector de

expresión constitutiva para un shRNA-RAC3 (shRAC3) o vector con inserto scrambled como control (SC). Como mencionamos anteriormente las células fueron colocadas en la parte superior del *transwell* con poro de 8 μm en medio DMEN+0.01%BSA en ausencia de suero, en la parte inferior se colocó medio DMEN con 10%SFB como quimioattractante. Las células fueron cultivadas en estufa a 37°C 5%CO₂ durante 16 hs, tras lo cual, las células que no invadieron junto con el *matrigel* fueron retiradas con un hisopo y las que lograron invadir fueron fijadas con formaldehído 1X, teñidas con *gelred* y contadas en microscopio de fluorescencia.

3.15- Ensayo de cicatrización de la herida

Células sobre-expresando o no RAC3 (HEK293, HeLa o T47D) fueron crecidas en placas de 6 posillos, cuando la monocapa llegó a confluencia se realizó la herida utilizando un tip de 200 μl , se lavó la monocapa para retirar las células sueltas, se agregó medio sin SFB para atenuar la proliferación y se estimuló con TNF (ver metodología del estímulo con TNF). Las células fueron incubadas a 37°C en atmosfera húmeda con 5% CO₂. La herida fue fotografiada a tiempo 0h (T0) y a 24h (T24). La migración de las células fue cuantificada usando el programa ImageJ, se trazaron líneas paralelas cruzando el área de la herida sin células y el número de píxeles fue determinado utilizando usando el comando de medida del programa. Se consideró la diferencia de la longitud de la línea a cada tiempo analizado (T0-T24) como medida directa de la distancia migrada por las células.

3.16- Detección de actividad metaloproteasa

La actividad gelatinolítica MMP2 y 9 fue detectada por el método de zimografía en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina 0,1%. Para ello células HEK293 o T47D con alto o bajo RAC3 fueron crecidos en placas de 6 posillos a 80% de confluencia, las monocapas fueron lavadas con PBS, se agregó medio en ausencia de SFB y se estimuló (ver metodología de estímulo con TNF) por 24h. Luego se tomaron los medios condicionados a partir de los cuales se detectó la actividad MMPs, las células de la monocapa fueron cosechadas para la determinación de la concentración de proteínas por el método Bradford.

Los medios condicionados fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida 9% copolimerizados con gelatina 1%, luego se realizaron 4 lavados con Buffer de incubación 2% tritón por 15 minutos c/u y 4 lavados con Buffer de

incubación por 5 minutos c/u, por último fueron colocados en Buffer de incubación fresco e incubados a 37°C durante 24h. Luego, los geles fueron teñidos con Comasiee Blue y destañados hasta revelar la banda de actividad gelatinolítica. Los geles fueron escaneados y las bandas de actividad fueron cuantificadas utilizando el programa ImageJ y relativizadas a la concentración de proteínas de donde provenían los medios condicionados. Como control negativo se utilizó el mismo procedimiento pero se incubó en Buffer de incubación más EDTA.

3.17- Determinación de las dosis óptimas H₂O₂ y Rapamicina como estímulo genotóxico

En orden de estandarizar la concentración óptima de H₂O₂ y Rapamicina, capaz de inducir senescencia por estrés genotóxico, analizamos la proliferación de células HEK293 *wild type* en presencia de dosis crecientes de H₂O₂ o Rapamicina. Para ello se colocaron 50.000 cells/posillo en placa de 24 posillos y 24 hs después fueron estimuladas con H₂O₂ o con Rapamicina, como control se utilizaron células sin estímulo. Luego de 24 hs de estímulo el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco y 6 días después, se evaluó la proliferación o senescencia.

3.18- Ensayo de actividad SA:βGal-ácida para la observación de senescencia

Las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X y fijadas por 5 min con formaldehído 3% a temperatura ambiente. Luego lavadas dos veces con PBS e incubadas por 16 h a 37 °C (sin CO₂) con la solución de tinción. SA-β-Gal staining solution: 1mg de 5- bromo-4-cloro-indolil D-galactosidasa (X-Gal) por ml (stock=20 mg de dimetil-formamida por ml)/ ácido cítrico 40 mM /fosfato de sodio, pH=6.0/ ferrocianuro de potasio 5mM / ferricianuro de potasio 5 mM / NaCl 150mM / KgCl₂ 2 mM (Dimri et al., 1995). Pasadas las 16 h, las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X y observadas en el microscopio y fotografiadas.

3.19- Ensayo de tinción con Hoechst para la observación de núcleos grandes

Para ellos se procedió con el mismo estímulo genotóxico antes mencionado, a los 6 días post estímulo las células fueron fijadas y teñidas con Hoechst 42333 5μg/ml

durante 10 minutos, las células fueron lavadas y la aparición de núcleos grandes fue evaluada por microscopia de fluorescencia y fotografiada.

3.20- Ensayo de proliferación y senescencia

Células transfectadas con el vector de expresión para RAC3 (RAC3) o el vector vacío (EV) fueron colocadas en placas de 96 posillos y estimuladas con, Rapamicina 50nM o H₂O₂ 150μM, como se describió anteriormente. La proliferación fue evaluada por tinción con cristal violeta en células control y tratadas a los días 0, 3 y 6 post estímulo, los resultados se expresaron como curva de proliferación respecto del tiempo 0.

El ensayo de proliferación en las células HeLa fue evaluado del mismo modo pero en ausencia de estímulo genotóxico.

La senescencia en células HeLa o células HEK293 transfectadas con el vector de expresión para RAC3 o el vector vacío (EV) fue evaluada al día 6 post estímulo utilizando el ensayo de SA: bGal-ácida o la tinción con Hoechst 33342 para la observación de núcleos grandes. El porcentaje de células SA-β-Gal+ o células con núcleos grandes+, fue determinada por conteo de un mínimo de 200 células por vidrio utilizando microscopio de fluorescencia.

3.21- Evaluación del ciclo celular por cartometría de flujo

Para el ensayo de FACs se siguió el protocolo descrito por (Rubio et al., 2006). Células transfectadas con el vector de expresión para RAC3 (EV) o el vector vacío (EV) fueron colocadas en placas de 96 posillos y estimuladas con, Rapamicina 50nM o H₂O₂ 150μM, como se describió anteriormente. Luego, 2x10⁶ células fueron lavadas con PBS e incubadas por 16 hs a 4°C con Ioduro de propidio a una concentración final de 50μg/ml en una solución conteniendo 0.1% citrato de sodio + 0.1% Triton. Las muestras fueron evaluadas en un clitómetro de flujo FACSCanto y los resultados fueron analizados con el programa FACSDiva (Rubio et al., 2006).

3.22- Ensayo de actividad telomerasa

Extractos totales de células HeLa transfectadas con shRNA-RAC3 o con el vector control (SC) fueron lisados con buffer de lisis CHAPS e incubadas 30 minutos

en hielo. Luego de una centrifugación a 16000g por 20 minutos a 4°C, alícuotas de sobrenadante fueron congeladas rápidamente a -80°C. La actividad telomerasa fue determinada utilizando el Kit SYBRGreen RQ-TRAP utilizando como los extractos obtenidos (Wege et al, 2003).

3.23- Ensayo de inmunofluorescencia (IF)

Para estos ensayos se colocaron cubreobjeto de vidrio estéril (*Fisherbrand*) en placas de 24 pocillos y se sembraron 5x10⁴ células en 500µl de medio de cultivo por pocillo.

Luego del estímulo (indicado en cada caso) se fijaron las células con una solución de 1% Glutaraldehído y 0,2% de Formaldehído. Se lavaron los vidrios (con las células adheridas) 3 veces con PBS y se permeabilizó con 0,2% de Tritón X-100 en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavó dos veces con PBS (para quitar el detergente) y luego se bloqueó con 10%SFB en PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó dos veces con PBS para retirar el exceso de bloqueo. Seguidamente se incubó toda la noche en cámara húmeda a 4°C con el anticuerpo primario disuelto en 10%/PBS. Al día siguiente se lavó tres veces 10 minutos con PBS y luego se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado al fluorocromo Fluoresceína o rodamina (1/1000 anti-ratón o anti-conejo según corresponda) una hora, se lavó tres veces con PBS y se montaron los vidrios con una solución 50% glicerol en PBS. Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio de fluorescencia *Olympus* acoplado a una cámara digital.

Las imágenes fueron procesadas utilizando el programa ImageJ y deconvolucionadas utilizando el programa LeichtDeco utilizando un PSF de 130.

3.23- Determinación de niveles de proteínas por Western Blot

3.23) A. preparación de extractos proteicos

Las proteínas totales de células en monocapa se obtuvieron a partir de placas de 6 pocillos al 80% de confluencia y estimuladas o no con los distintos estímulos (ver metodología de estímulo). Las monocapas celulares fueron lavadas 2 veces con PBS, luego se agregó 0.5ml de PBS, se despegaron las células con rastrillo y se colectaron a microtubos. Se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos a

4°C y el pellet celular resultante se resuspendió con un volumen de pellet de *buffer* de Lisis en hielo por 15 minutos. Luego se centrifugó a 4°C a 10000rpm 10 minutos y el sobrenadante libre de ADN se trasvasó a nuevos microtubos. Finalmente se determinó la concentración de proteínas y se desnaturizó la muestra a 95°C por 5 minutos en cracking *buffer* con SDS y β -mercaptoetanol.

TNE	BUFFER DE LISIS
10mM Tris-HCl pH 7,5	20mM Tris-HCl pH 6.7
1mM EDTA	70mM NaCl
150mM NaCl	1mM EDTA
	10% Glicerol
	1% Triton X-100
	0,5% NP-40
	1mM DTT
	0,5 mM PMSF

B. determinación de la concentración de proteínas

La determinación de la concentración se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford. La absorbancia se midió a 595nm en un lector de Elisa. La concentración se determinó por interpolación de la absorbancia en el rango de linealidad del método (0,05-0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) con una curva estándar de la proteína Albumina sérica bovina pura BSA (0,1-10 μg), que se realizó en paralelo y en el momento.

3.23) B- electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizantes (sds-page) y transferencia a membrana

Las electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó utilizando mini-geles discontinuos, entre 6-8% de acrilamida/bis-acrilamida con SDS. Se sembraron de 50 a 100ug de proteínas en *Laemmli buffer* y el marcador de peso molecular (*Full range Rainbow, Amersham*) como referencia. La corrida electroforética se realizó en cubas para minigeles (C.B.S. *Scientific Co.*) a 100V utilizando *buffer* de corrida 1X. Una vez terminada la electroforesis los geles se lavaron en *buffer* de transferencia eliminando el exceso de detergente y se transfirió las proteínas por electroforesis a membranas de Nitrocelulosa (*Amersham*) utilizando el sistema

semidry de BioRad 45 minutos a 15V. Una vez terminada la transferencia, se tiñó la membrana con *rojo ponceau*, para controlar la transferencia de las proteínas.

3.23) C- ensayo de western blot (WB)

La membrana se incubó con 5% leche en polvo descremada en T-TBS por 1 hora a temperatura ambiente para bloquear el pegado inespecífico. Luego se realizaron dos lavados de 5 minutos cada uno con T-TBS para quitar el exceso de leche. Seguidamente se incubó con el anticuerpo primario diluido en T-TBS 0,5% BSA de 2-4 hs a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C (de acuerdo a lo previamente establecido como óptimo para cada anticuerpo). Se hicieron tres lavados de 10 minutos cada uno con T-TBS, para quitar el exceso del anticuerpo. Se incubó con el anticuerpo secundario especie específico conjugado con la enzima HRP (peroxidasa de rabanito) por 45 minutos a temperatura ambiente. Luego se hicieron tres lavados de 10 minutos cada uno con T-TBS y un último lavado con TBS (sin *Tween* 20) para eliminar el detergente que interfiere con la reacción quimioluminiscente. La membrana se cubrió con la solución de luminol (*New England Nuclear, Boston, MA, USA*), luego se colocó en un chasis y por encima de la membrana cubierta de nylon transparente se montó la película radiográfica (AGFA). Se expuso durante 1 a 15 minutos en oscuridad y se reveló con el kit de revelado (AGFA).

BUFFER FOSFATO SALINO (PBS) 10X
2gr KCl
80gr NaCl
2gr KH ₂ PO ₄
6,1gr Na ₂ PO ₄

LAEMMLI BUFFER 5X
0,3M Tris-HCl pH 6.8
10% SDS
40% Glicerol
0,01% Bromo fenol azul
20% β-mercaptoetanol

BUFFER DE LISIS
50mM Tris pH 7.5
15mM HEPES
0,3M NaCl
2 mM EDTA
1% Triton X-100
1mM DTT
0,5mM PMSF

T-TBS
20mM Tris pH 7.6
9g/l NaCl
0,05% <i>Tween</i> 20

BUFFER DE CORRIDA (TRIS-GLICINA-SDS)
25mM Tris Base
250mM Glicina
0,1% SDS

BUFFER DE TRANSFERENCIA
125mM Tris
965mM Glicina
20% Metanol

Anticuerpos utilizados

Para los ensayos de *western blot*, inmunofluorescencia se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios y secundarios.

Anticuerpo	Proveedor	PM (kDa)
RAC3	<i>Santa Cruz</i>	160
β -Catenina	Santa Cruz	98
RelA	<i>Santa Cruz</i>	65
Vimentina	<i>Santa Cruz</i>	57
E-Cadherina	<i>Santa Cruz</i>	120
P21	<i>Santa Cruz</i>	21
P16	<i>Santa Cruz</i>	16
P53	Santa Cruz	53
Tubulina	<i>Santa cruz</i>	55
CD44	ebioscience	85 a 250
Ciclina E	Santa Cruz	

Anticuerpo	Proveedor
Ratón/Conejo FITC	<i>Vector</i>
Ratón/Conejo Rodamina	<i>Vector</i>
Ratón/Conejo HRP	<i>Vector</i>

3.24- Determinación de mRNA por RT-qPCR

3.24) A- extracción de RNA

El RNA fue extraído por el método *ONESTEP* RNA (Biobasic Incorporation) siguiendo las recomendaciones del fabricante, luego se agregó 100ul de cloroformo y se agitó 30 segundos. Seguidamente se extrajo la fase acuosa y se precipitó el ARN total, se resuspendió en agua estéril libre de RNAasa.

Las concentraciones de ADN y ARN usadas en este trabajo se cuantificaron midiendo la absorbancia a una longitud de onda de: 260nm en el espectrofotómetro (*GeneQuant*, *Pharmacia*). La concentración se calculó utilizando el factor de conversión basado en el coeficiente de extinción para cada ácido nucleico (A_{260} of 1.0 = 50µg/ml para ADN doble cadena y 40µg/ml para ARN) y multiplicando por el factor de dilución empleado en cada medición. Por otro lado se leyó la absorbancia a 280nm para detectar la presencia de aminoácidos aromáticos que evidencian la presencia de proteínas, y la absorbancia a 230nm para determinar la presencia de contaminantes o productos no deseados de la extracción. Luego se calculó la relación A_{260}/A_{230} deseándose mayor a 1.7. En el caso de las muestras de ARN también se leyó absorbancia a 320nm como indicador de la dispersión de luz, que fue restado al resto de las lecturas obtenidas, previo a la realización de los cálculos.

B-geles nativos de agarosa

Para preparar los geles de agarosa utilizados en los experimentos con ADN se disolvió agarosa por ebullición en *buffer* TAE 1X. Los porcentajes de agarosa usados fueron entre 1% a 3% dependiendo del tamaño de banda a observar. Una vez tibio se agregó 0,5µg/ml de bromuro de etidio (*Invitrogen*). La electroforesis se realizó a voltaje constante entre 5-10V/cm. La muestra a sembrar se resuspendió en *buffer* de siembra preparado con glicerol 30% v/v, azul de bromofenol y xilencianol. Los geles fueron visualizados bajo luz UV en transiluminador y fotografiados con cámara digital (Kodak).

3.24) B- amplificación de cDNA por RT-qPCR

La transcripción reversa se realizó en una mezcla conteniendo 1ul de mix de dNTPs 10mM, 1ul oligo(dt)25, *buffer*, 1ul DTT 1M, 1ul *RNasa* OUT y 1ul de Transcriptasa reversa *SuperScript II* (*Invitrogen*) en un volumen final de 20ul con agua libre de DNasas y RNasas. La síntesis del ADN copia se realizó en un termociclador *Eppendorf*, según instrucciones del fabricante 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 37°C y 15 minutos a 70°C. El ensayo de qPCR se hizo con el ADN copia procedente de 50ng de cada muestra de ARN llevados a un volumen constante en presencia del intercalante de ADN SYBR *green* 2x (*Bio-Rad*). Cada muestra se amplificó por triplicado. La cuantificación se realizó con los *primers* mostrados en la tabla para cada caso. Los niveles de expresión específica de un ARNm fueron normalizados contra un ARNm “*housekeeping*”. Los resultados son expresados en cantidades de veces con respecto al control. Ensayo de PCR se hizo con el ADN copia procedente de 50ng de cada muestra de ARN llevados a un volumen constante. Cada muestra se amplificó por triplicado.

Tabla con secuencias de primers

Transcripto	Secuencia
RAC3	FW: 5'-AAGTGAAGAGGGATCTGGA-3' RV: 5'- CAGATGACTACCATTTGAGG-3'
Vimentina	FW: 5'-GAACCTGAGGGAACTAATCTG-3' RV: 5'-CTGAGAAGTTTCGTTGATAACC-3'
E-Cadherina	Fw: 5'-TGGTCAAAGAGCCCTTACTG-3' RV: 5'-CAAGTCAAAGTCCTGGTCCT-3'
SNAIL	Fw: 5'- CTTCCAGCAGCCCTACGAC-3' RV: 5'-CGGTGGGGTTGAGGATCT-3'
MMP2	FW: 5'-CCAGAATACCATCGAGACCA-3' RV: 5'-GTAGCCAATGATCCTGTATGTG-3'
P21	FW: 5'-ACCTGTCACTGTCTTGTACC-3' RV: 5'-TGGTAGAAATCTGTCATGCT-3'
GAPDH	FW: 5'-TCTCCTCTGACTTCAACAGC-3 RV: 5'-GTTGTCATACCAGGAAATGA-3'

3.25- Análisis de expresión de genes reporteros

3.25) A- cosecha de células y preparación de extractos

Los ensayos reporteros se realizaron en placa de 24 pocillos donde se transfectaron transitoriamente células con los distintos plásmidos reporteros conteniendo el gen Luciferasa en cada caso (ver Resultados), más el vector RSV- β -Galactosidasa como control interno (en cantidades limitantes). A las 24 horas fueron tratadas con el estímulo indicado en cada caso. Luego del tiempo indicado se lavaron dos veces con PBS, y se agregó 100 μ l de *Reporter Lysis Buffer*(Promega) a cada pocillo por 15 minutos a temperatura ambiente. Se colectó el lisado en microtubos y se centrifugó 5 minutos a 10000rpm. Se tomó el sobrenadante y se separaron 15 μ l en un microtubo para medir actividad Luciferasa y 50 μ l en pocillos de una placa de 96 pocillos para medir actividad β -galactosidasa.

3.25) B- detección de actividad Luciferasa

El ensayo de actividad de la enzima Luciferasa se realizó agregando 50 μ l del reactivo *Luciferase Assay System* (Promega) a los 15 μ l de muestra o de *buffer* de lisis como control (blanco). Rápidamente se colocó el microtubo en el luminómetro (*Triathler, Hidex*) y se tomó la lectura a los 30 segundos para cada

tubo. Las Unidades Relativas de Luminiscencia (U.R.L.) fueron normalizadas según los valores obtenidos en la medición de actividad β -Galactosidasa.

3.25) C- medición de actividad β -galactosidasa

Para medir la actividad β -Galactosidasa presente en los 50 μ l de extracto, se agregaron 50 μ l de *buffer* β -Gal 2X que contiene el sustrato cromogénico ONPG (orto-nitro-fenil-galactósido). Se incubó entre 30-60 minutos a 37°C protegido de la luz. Una vez que la reacción viró de incoloro a color amarillo, se frenó la misma con 100 μ l de Na₂CO₃ 1M. La absorbancia se midió a 405nm en un lector para Elisa.

BUFFER β-GALACTOSIDASA 2X
0,2M NaH ₂ PO ₄
0,2M NaH ₂ PO ₄
0,1M β -Mercaptoetanol
1,33mg/ml ONPG

3.26- Modelo experimental *in vivo*

Para el desarrollo de estos experimentos se utilizaron ratones nu/nu de 7 a 10 semanas de edad que fueron mantenidos en condiciones de esterilidad y alojados en *racks* ventilados. Los animales recibieron comida y bebida *ad libitum* y fueron mantenidos en habitaciones con aire acondicionado a 20 \pm 2 °C con períodos de luz y oscuridad de 12 h. El cuidado y manipulación de los animales estuvo de acuerdo con las normas vigentes acorde a los lineamientos recomendados por el NIH y el Comité Británico sobre el bienestar de los animales utilizados en investigación experimental en cáncer(United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research, 1998; Workman et al., 2010). Ello significa que en todos los casos estuvo previsto sacrificar a los animales cuando el diámetro mayor tumoral llegara a los 17 mm, o cuando el tumor se ulcerase o el animal demuestre un mal estado general, como por ejemplo caquexia.

Los animales fueron agrupados azarosamente de a 6 por tratamiento e inoculados con 200 μ l de una suspensión de 2x10⁶ células en PBS (5x10⁶/ml) de células HEK293 tipo salvaje, estables pCMV-tag2B-RAC3, o estables EV en forma subcutánea en ambos flancos. El crecimiento tumoral fue monitoreado tres veces por semana. Se midieron dos diámetros de los tumores con un calibre y se calculó el

volumen tumoral con la fórmula $\frac{4}{3} \pi \text{ radio menor}^2 \times \text{radio mayor}$ (Bruzzone et al., 2008).

3.27- Análisis bioinformático

Para tener una idea más amplia respecto del rol de sobreexpresión de RAC3 y la adquisición de un fenotipo de célula madre tumoral, se analizó la correlación entre los niveles de RAC3 con los niveles de expresión de marcadores de células madre tumorales a partir del análisis bioinformático de bases de datos de repositorios públicos de microarrays.

- Análisis los niveles de RAC3 en la plataforma GSE24747 Affymetrix, Santa Clara, CA, USA.

En estos experimentos se analiza los niveles de mRNA a partir de la side population CD133+ en relación a su contraparte no CMT de células tumorales CaCo.

- Análisis de los niveles de RAC3 y ABCG2 en las plataforma Affymetrix Santa Clara, CA, USA.

En estos experimentos se analizan los niveles de mRNA a partir de células de cáncer de ovario, cáncer de y leucemias, resistentes a Metrotexato, Paclitaxel y Ciclofosfamida con respecto a su contraparte no resistente.

Todas las secuencias nucleotídicas utilizadas para el diseño de primers fueron obtenidas del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) consultando la base de datos adecuada en cada caso. Para el diseño de *primers* se utilizó el programa *BlastPrimer* y *Perlprimer*.

3.28- Análisis estadístico

Los datos fueron analizados aplicando T-test o ANOVA de un factor seguido por test de Tukey. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$ o $p < 0.01$.

4. RESULTADOS

"Cuando uno ve a alguien esforzándose, a pesar de todos los obstáculos, a pesar de todas las circunstancias, lo que está viendo es, en sí, la imagen de la victoria"

Daisaku Ikeda

Parte I

4.1- La sobreexpresión de RAC3 es un factor transformante

4.1) A- RAC3 favorece la proliferación independiente de factores de crecimiento

Las CMT tienen la capacidad de secretar factores de crecimiento, citoquinas y factores angiogénicos y por lo tanto muestran una predisposición a mantener un crecimiento autócrino y para estimular la angiogénesis (Kucia and Ratajczak 2006, Piscaglia et al, 2008). Ha sido reportado que el crecimiento de células tumorales en condiciones reducidas de suero aumenta la población CMT (Eyler and Rich, 2008; Tavaluc et al., 2007) lo que demuestra la independencia de factores de crecimiento para la proliferación de CMT y que efectivamente en la heterogeneidad intratumoral existen subpoblaciones que responden diferencialmente a la condiciones del entorno tumoral.

En relación al concepto de heterogeneidad intratumoral en el año 2012 publicamos un trabajo que demuestra que, si bien Ciclina D1 y RAC3 son moléculas altamente expresadas en tumores mamarios, cuando se sobre-expresan juntas en la misma célula, sus efectos son mutuamente antagónicos, la proliferación se ve inhibida y se pierde la capacidad de crecer independientes de anclaje (Rubio et al., 2012). De estas observaciones se desprende que, quizás, RAC3 no esté elevado homogéneamente en todas las células de un mismo tumor y podrían existir subpoblaciones llevando altos niveles de expresión de RAC3. En el mismo trabajo demostramos que CiclinaD1 es un correpresor del factor de transcripción NF- κ B mientras que RAC3 es un coactivador de dicho factor de transcripción, indicando que este efecto antagónico sobre la proliferación, probablemente se deba a la inhibición del factor de transcripción NF- κ B tan involucrado en la tumorigénesis y el mantenimiento de CMT

En el presente trabajo analizamos el potencial proliferativo de la sobreexpresión de RAC3 en ausencia de factores de crecimiento. Para ello, en células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o no (EV) RAC3 se analizó la proliferación a 24, 48 y 72 hs en condiciones de bajo suero fetal bovino (0.1% SFB) o presencia (10% SFB) de suero fetal bobino (SFB) tal como se explica en materiales y métodos (Figura1A). Los niveles de expresión de RAC3 se muestran en Materiales y Métodos.

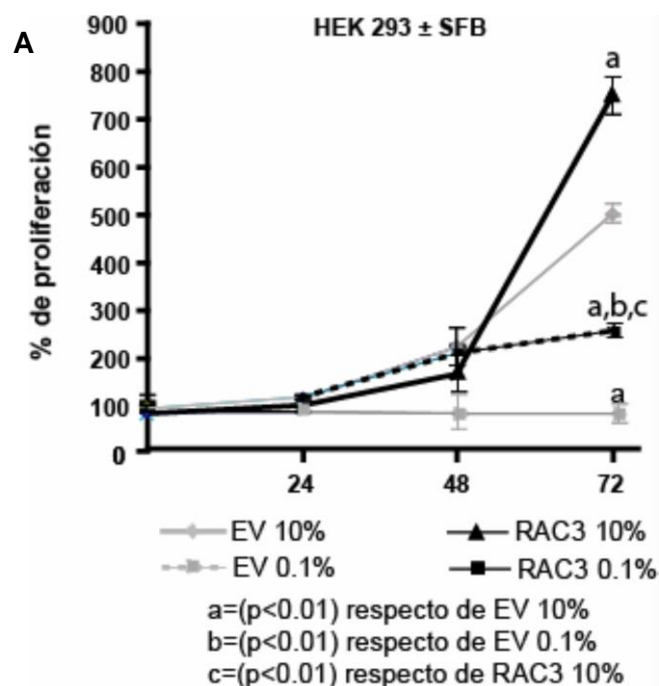


Figura 21: Proliferación en ausencia de factores de crecimiento. Como se describe en materiales y métodos, células HEK293 con sobreexpresión de RAC3 (RAC3) o control (EV) RAC3 fueron crecidas en placa de 96 posillos. Luego de 24 hs el medio fue reemplazado por medio fresco en 2 condiciones distintas, medio DMEN completo (10% SFB) o medio DMEN con bajo SFB (0.1% SFB) y se cultivaron en estufa a 37°C, 5% CO₂ por 24, 48 y 72 hs, en cada tiempo las células fueron fijadas. El número de células fue cuantificado por espectrofotometría a 570 nm por tinción con cristal violeta. Los datos representan la media ± SD de tres experimentos independientes (ANOVA; Tukey/ p<0.01).

Como se muestra en la figura 21, en la condición 10% SFB la sobreexpresión de RAC3 induce un aumento significativo en la proliferación celular con respecto a las células que expresan niveles basales del coactivador (RAC3 10% respecto de EV 10%). Sin embargo, en la condición 0.1% SFB, las células que sobre-expresan RAC3 adquieren la capacidad de proliferar aun en ausencia de factores de crecimiento a diferencia de lo que ocurre en las células que expresan niveles basales de coactivador (RAC3 0.1% respecto de EV 0.1%). Estos resultados permiten concluir que la sobreexpresión de RAC3 favorece la proliferación celular aún en condiciones de restricción de nutrientes.

En relación a ello ha sido previamente reportado que las células madre presentan un ciclo celular más corto por acortamiento de la fase G1 y frecuentemente pueden saltarse el punto de restricción G1 por un aumento en la expresión de Ciclina E. En relación a ello, ha sido reportado que RAC3 es un coactivador de E2F aumentando su actividad, por lo cual la sobreexpresión de RAC3 podría estar aumentando los niveles de Ciclina E, favoreciendo de este modo la progresión de ciclo celular en ausencia de factores de crecimiento. Analizamos entonces los niveles de

Ciclina E en células HEK293 sobre-expresando RAC3 (RAC3) o con niveles basales (EV) en condiciones de 0.1% o 10% SFB (Figura 22)

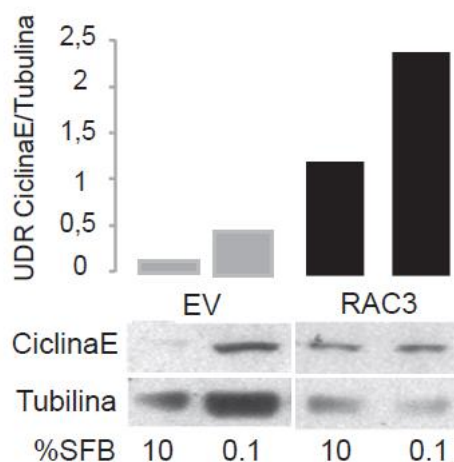


Figura 22: La sobreexpresión de RAC3 induce la expresión de Ciclina E. Los niveles de Ciclina E fueron analizados por WB a partir de extractos proteicos totales de células HEK293 sobre-expresando RAC3 (RAC3) o con niveles basales (EV) en condiciones óptimas de crecimiento (10%SFB) o en condiciones reducidas de nutrientes (0.1%SFB).

Los resultados demuestran que la sobreexpresión de RAC3 induce la expresión de Ciclina E en condiciones normales de crecimiento (10%SFB) y este efecto es potenciado en condiciones reducidas de nutrientes (0.1% SFB), indicando que la sobreexpresión de RAC3 aumenta los niveles de Ciclina E.

4.1) B- La sobreexpresión de RAC3 promueve la expresión de marcadores stem tumoral

En los primeros intentos por aislar células madre tumorales, se recurrió al uso de marcadores de células madre normales como CD44 o CD133 . De este modo se asoció la sobreexpresión de estos marcadores en células tumorales, con la adquisición de características de célula madre tumoral.

Tal como se describió en la introducción, CD44 es el receptor de ácido hialurónico, un componente de la matriz extracelular y el principal componente de la matriz extracelular del nicho stem cell . La sobreexpresión de CD44, a sido asociado al aumento de la capacidad metastásica en células tumorales altamente invasivas, que con frecuencia involucran a la subpoblación de CMT .

Se investigó si los efectos transformantes asociados a la sobreexpresión de RAC3, podrían involucrar la sobreexpresión de CD44 (Figura23).

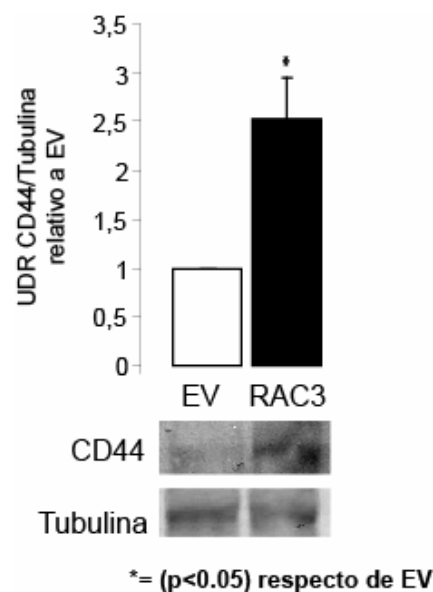


Figura 23: La sobreexpresión de RAC3 aumenta los niveles de CD44. Los niveles de CD44 fueron analizados por WB a partir de extractos totales de células HEK293 sobre-expresando RAC3 (RAC3) o con niveles basales (EV). Las barras representan la media \pm SD de tres experimentos independientes (T-test, $p<0.05$).

Los niveles de esta molécula fueron determinados por WB, en células con sobreexpresión de (RAC3) o niveles basales (EV) RAC3. Como podemos observar, los resultados obtenidos demuestran que la sobreexpresión de RAC3 produce un aumento significativo en la expresión de CD44. El aumento se produce principalmente en la variante de 120KDa.

También se analizó la localización subcelular por IF (Figura 24A). Los resultados concuerdan con lo observado por WB, observándose un aumento en los niveles de expresión de CD44, que localiza membrana plasmática.

Por otro lado, cuando se analizó la expresión de esta molécula en células HeLa que naturalmente expresan altos niveles de RAC3 y cuya expresión fue silenciada por transfección con un shRNA-RAC3, mostraron una notable disminución en los niveles de CD44 respecto de las células tipo salvaje (Figura 24B)

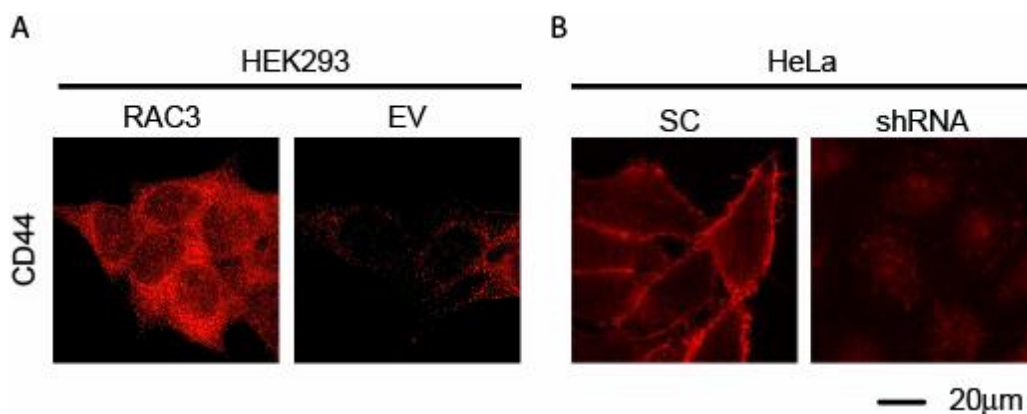


Figura 24: Localización subcelular de CD44. Células HEK293 sobre-expresando RAC3 (RAC3) o no (EV) y células HeLa control (SC) o con RAC3 silenciado (shRNA-RAC3) fueron fijadas e incubadas *over night* con anti-CD44 IM7 y con anticuerpo secundario

El análisis de bancos de datos de repositorios públicos de microarrays nos permitieron corroborar los hallazgos hasta aquí mostrados, en cuanto a la coexpresión o altos niveles de marcador stem tumoral y RAC3. Se analizó la expresión de RAC3 en un modelo experimental en el cual se compara el crecimiento de células de glioblastoma CaCo crecidas en condiciones 3D o en monocapa (GSE24747 Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) que muestran una expresión diferencial de marcador de células madre tumorales CD133+ en condiciones de cultivo 3D. Nuestro análisis de estos datos muestra un aumento significativo de RAC3 por crecimiento en 3D, coincidente con la alta expresión de CD133, con respecto a las células crecidas en monocapa CD133 – (Figura 25).

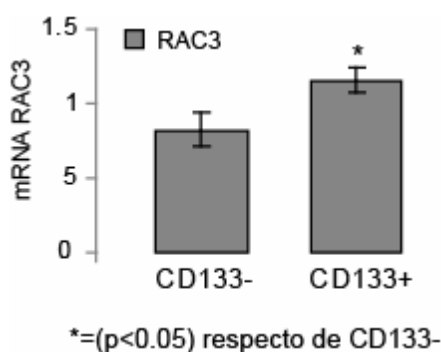


Figura 25: Niveles de mRNA RAC3 en *side population* CD133. Niveles de mRNA de RAC3 del banco de datos de repositorios públicos de microarrays, GSE24747 Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) T-test, $p < 0.05$

De acuerdo con estos resultados puede concluirse que la sobreexpresión de RAC3 estaría asociada a la expresión de marcadores de células madre tumorales y no

solo en la línea celular HEK293, sino también en subpoblaciones enriquecidas en stem tumorales.

A partir de estos resultados se puede concluir que la sobreexpresión de RAC3, además de promover la transformación tumoral podría estar favoreciendo quizás la expresión de marcadores stem, o bien, una reprogramación genética compatible con la adquisición de características de células madre tumorales.

Estudios previos han asociado a la sobreexpresión de RAC3 con un rol anti-apoptótico (Colo et al., 2007; Colo et al., 2008) así como la resistencia a drogas quimioterapéuticas como Doxorrubicina, Paclitaxcel y Cisplatino, comparada con células no resistentes (Cheryl A Sherman Baust 2011, Vijay Rathod 2014).

Las células madre tumorales son las responsables de la persistencia de la enfermedad ya que son más resistentes a las terapias antitumorales y esto ha sido adjudicado en gran medida a una expresión/actividad aumentada de proteínas involucradas en la resistencia a multidrogas (MDR). En base a esta característica de las CMT, se ha utilizado la propiedad de miembros de la flia MDR para la exclusión de colorantes como la base para técnicas cuantitativas y de identificación de poblaciones CMT en una muestra biológica. Por lo tanto, para determinar si efectivamente la sobreexpresión de RAC3 estaría asociada principalmente a subpoblaciones celulares con características de CMT, se utilizó la técnica de eflujo de Hoechst. En estos ensayos, se determinó la cantidad de Hoescht intracelular retenido luego de 90 minutos en células HEK293 sobreexpresando RAC3 (RAC3) o con niveles endógenos (EV), en presencia o ausencia de Verapamilo (inhibidor de bombas ATPasas de la familia MDR) tal como se describe en materiales y métodos (Figura 26). De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede observar que el agregado de Verapamilo produjo un cambio significativo aumentando la retención de Hoescht respecto de la condición sin inhibidor solo en células sobreexpresando RAC3, demostrando que solo en esta población celular podrían detectarse CMT compatibles con la expresión de MDR susceptibles de inhibición por Verapamilo.

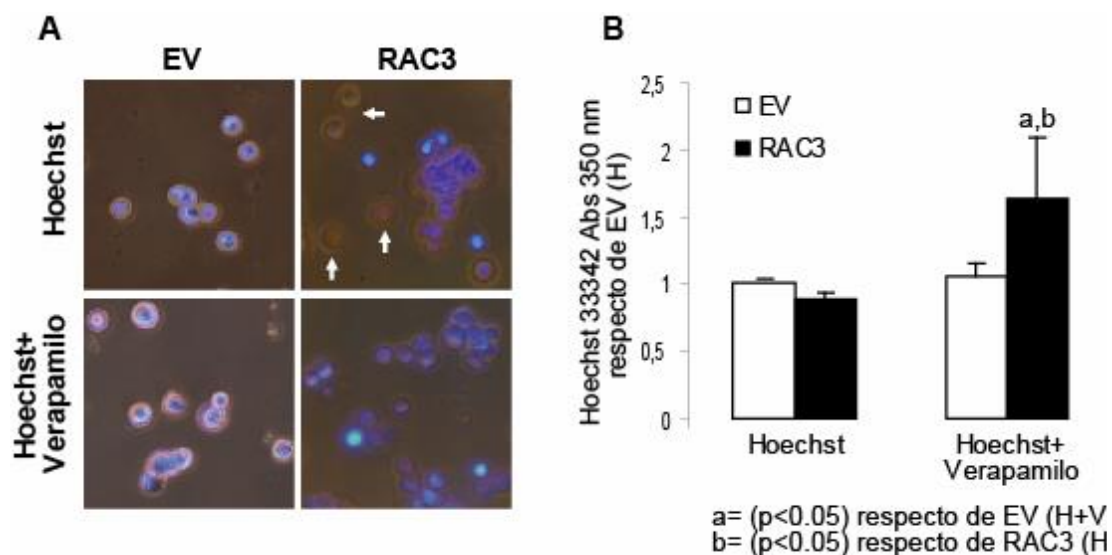


Figura 26: Ensayo de exclusión de Hoechst 42333. Células HEK293 sobre-expresando RAC3 (RAC3) o con niveles endógenos (EV) fueron teñidas en suspensión durante 90 min. con Hoechst 42333 en presencia (H+V) o no (H) de Verapamilo. A) muestra las fotografías de células teñidas con Hoechst donde se superpuso la fotografía en campo claro a modo de mostrar las células capaces de excluir el Hoechst (flechas). B) Cuantificación del Hoechst intracelular por espectrofotometría a 350nm. Las barras representan la media \pm SD de tres experimentos independientes. ANOVA (Tukey, $p<0.05$).

De acuerdo con los resultados obtenidos en cuanto a la capacidad de expulsión de Hoechst en células HEK293 que sobre-expresan RAC3 se analizaron los niveles de RAC3 y ABCG2 (proteína de resistencia a multidrogas) en distintas plataformas de bases de datos de microarrays, correspondientes a células tumorales de mama resistentes de Paclitaxel, células de leucemia resistentes a Ciclofosfamida y células tumorales de ovario resistentes a Metrotexato, comparadas con su contraparte sensible a dichas drogas (Figura 27).

Como muestra la figura, las células de mama, leucemia y ovario resistentes a las drogas antes mencionadas, muestran un significativo aumento en los niveles de expresión de RAC3 que correlaciona con un aumento en los niveles de la proteína de resistencia a multidrogas ABCG2.

Estos resultados se encuentran en concordancia con las observaciones previas de nuestro grupo (Colo et al., 2007; Colo et al., 2008) y otros autores (Cheryl A Sherman Baust 2011, Vijay Rathod 2014) en cuanto a quimioresistencia y además avalan la utilización de la técnica de exclusión de fluorocromo en nuestro modelo para la identificación de CMT, dado que existe una correlación entre la expresión aumentada de RAC3 y MDR.

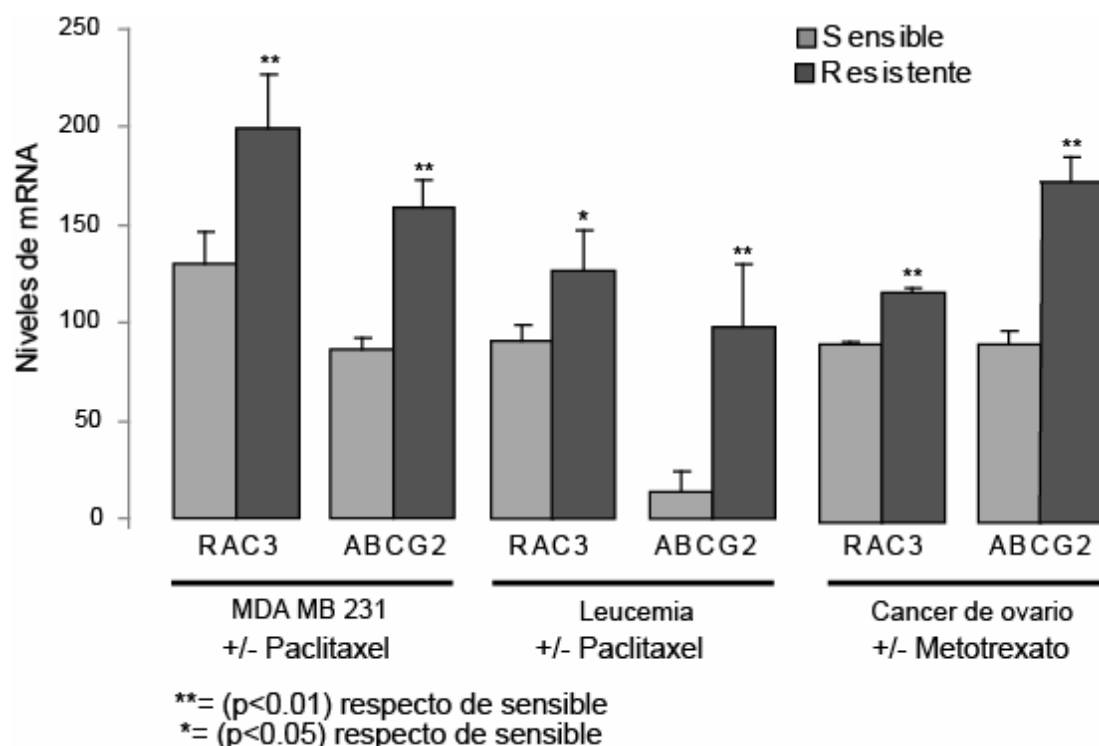


Figura 27: Niveles de RAC3 y ABCG2 en distintas líneas celulares. Niveles de mRNA de RAC3 del banco de datos de repositorios públicos de microarrays a partir de células de cáncer de mama resistente a Paclitaxel, células leucémicas resistentes a Ciclofosfamida y células de cáncer de ovario extraídas de pacientes resistentes a Metotrexato (gris oscuro) comparadas con células sensibles a dichas drogas (gris claro). GDS4078, GDS2729 y GSE73935 respectivamente, Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) T-test.

4.1) C- RAC3 aumenta la capacidad clonogénica y la formación de tumor-esferas

Las CMT tienen capacidad de autorrenovación y son las responsables de la persistencia y crecimiento del tumor luego de terapias antitumorales. Por ejemplo, para el estudio de células madre tumorales humanas se han desarrollado los ensayos *in vitro* como capacidad de formar colonias y capacidad de formar tumor-esferas en suspensión. Esos estudios miden la capacidad de una célula tumoral para formar colonias multicelulares, sugiriéndose que esta capacidad sólo está presente en algunas células tumorales con características de células madre y por tal motivo se las considera como células iniciadoras de tumor.

Por tal motivo se quiso determinar si la sobreexpresión de RAC3 aumenta la capacidad de células HEK293 para formar colonias a partir de una única célula, mediante el uso de un ensayo clonogénico como se detalla en materiales y métodos. Para ello, se plaquearon 200, 400 y 800 células por posillo de clones HEK293 sobre-

expresando (RAC3) o no (EV) RAC3 y luego de 7 días se cuantificó el número de colonias en cada condición (Figura 28).

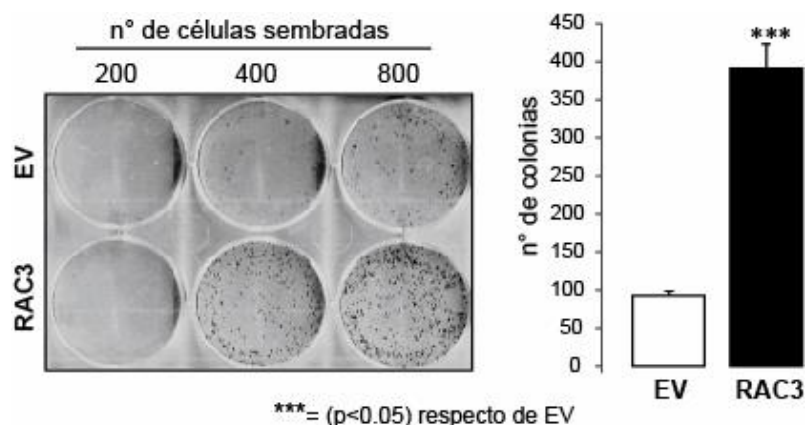


Figura 28: La sobreexpresión de RAC3 aumenta la capacidad clonogénica. Como se describe en materiales y métodos, células HEK293 con alto (RAC3) o bajo (EV) RAC3 fueron crecidas en densidades de 200, 400 y 800 células por posillo, 7 días post plaqueo las colonias fueron fijadas, teñidas con cristal violeta y contadas. Las barras representan la media \pm SD de tres experimentos independientes, (T-test, $p < 0.05$).

Los resultados obtenidos demostraron que la sobreexpresión de RAC3 aumenta significativamente la capacidad clonogénica comparado con el control.

En otra serie de experimentos se investigó si la sobreexpresión de RAC3 podría otorgar a las células HEK293 la capacidad de formar tumor-esferas en suspensión. Para ello clones sobre-expresando (RAC3) o con niveles endógenos (EV) de RAC3, fueron crecidos en suspensión, en placas con 1% agar, en medio DMEN+2.5%SFB. La formación de colonias en suspensión o tumor-esferas fue cuantificada al día 15 de cultivo (Figura 29). Como se muestra en la figura, la sobreexpresión de RAC3 favorece el crecimiento de tumor-esferas en suspensión mientras que las células control fueron prácticamente incapaces de generarlas.

De acuerdo con estos resultados, las células HEK293 sobre-expresando RAC3 adquieren la capacidad de formar tumor-esferas en suspensión y en condiciones reducidas en factores de crecimiento, lo cual indica la capacidad de crecer independientes de anclaje, una capacidad que habíamos descripto previamente en el laboratorio pero con la diferencia de que en esta oportunidad el ensayo se hizo en condiciones reducidas de nutrientes (2,5% SFB) lo cual reduce la cantidad de factores diferenciadores existentes en el SFB y por lo tanto se puede asociar a la capacidad de formar tumor-esferas con características de CMT. A su vez, estos resultados, concuerdan con lo observado anteriormente en cuanto a la capacidad de proliferar en condiciones reducidas de factores de crecimiento (Figura1).

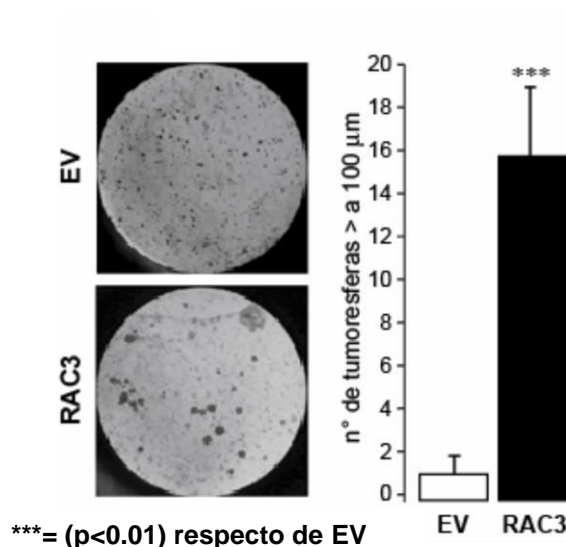


Figura 29: La sobreexpresión de RAC3 aumenta la capacidad de formar tumor-esferas en suspensión. Como se describe en materiales y métodos, células HEK 293 sobre-expresando (RAC3) o no (EV) RAC3, fueron crecidas en suspensión en medio DMEN+2.5%SFB, 15 días después se tomaron fotografías a 5X y se cuantificó el número de tumor-esferas, se consideró como tumor-esferas para el conteo solo aquellas mayores a 100μm. Las barras representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

Hasta aquí hemos demostrado que la sobreexpresión de RAC3 induce un aumento en la proliferación aún en condiciones reducidas de factores de crecimiento, un aumento del potencial clonogénico, expresión aumentada de marcadores stem, siendo todas estas características compatibles con un fenotipo tumoral y más aún con un fenotipo de célula madre tumoral.

4.2- Otras evidencias de transformación tumoral por sobreexpresión de RAC3

4.2) A- La sobreexpresión de RAC3 favorece la formación de esferoides

Una de las características de las células tumorales malignas, más allá de una alta tasa de proliferación es su capacidad de migrar e invadir generando metástasis, propiedad que ha sido adjudicada a las CMT que son las únicas capaces de regenerar un tumor. Por lo tanto, a continuación se describen los resultados obtenidos sobre otros efectos transformantes por sobreexpresión de RAC3 que fueron investigados.

En los últimos años se ha avanzado en el uso de agregados celulares tridimensionales o esferoides para el estudio in vitro de la biología tumoral. Muchos estudios revelan que las células cancerosas poseen capacidades variables en la formación de esferoides compactos y se ha sugerido que dicha capacidad tiene una correlación positiva con el potencial tumorigénico de dichas células. Por tal motivo

analizamos si la sobreexpresión de RAC3 favorece la formación de esferoides compactos, para ello, clones con alto o bajo RAC3 fueron colocados en placa multiwell impregnados de agarosa, en medio DMEM en ausencia de SFB y se cultivaron en estufa por 24 (Figura 30)

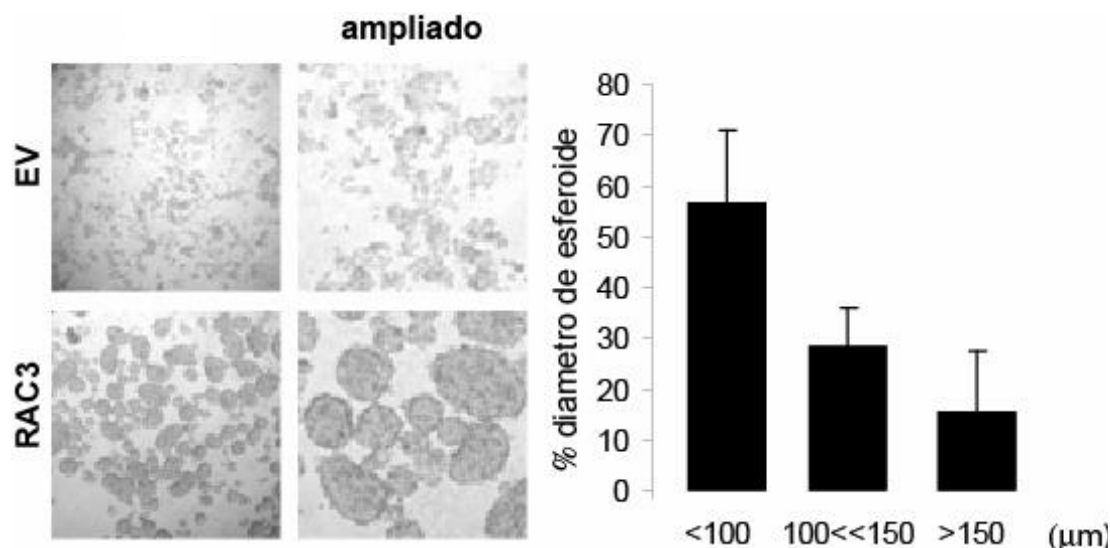


Figura 30: La sobreexpresión de RAC3 favorece la formación de esferoides compactos. Células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o no (EV) RAC3, fueron colocadas en placas impregnadas con agarosa en medio DMEN y se cultivaron en estufa a 37°C, 5%CO₂ por 24hs. Los esferoides fueron fotografiados a una magnitud 20X.

Los resultados obtenidos demuestran que las células con alto RAC3 forman un gran número de esferoides compactos comparado con el control, lo cual estaría indicando una alta capacidad de agregación que podría deberse a un aumento en la adhesión célula-célula o bien un aumento en la secreción de proteínas de matriz extracelular y de integrinas lo cual favorecería la agregación.

Muchos estudios han descrito el rol de Cadherinas e integrinas en el proceso de formación de esferoides (Casey et al., 2001). Por ejemplo, se ha demostrado que E-Cadherina es la proteína responsable para la formación inicial de esferoides en líneas celulares como MCF7, T47D, BT474 y MDA-MB 361, mientras que las Integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$ son las responsables de la formación de esferoides en las líneas celulares MDA-MB 231 y SKBR3 (Ivascu and Kubbies, 2007). Las líneas celulares que requieren de E-Cadherina para la formación de esferoides poseen baja capacidad metastásica. Por el contrario las líneas celulares que requieren de integrinas para la formación inicial de esferoides tienen alta capacidad metastásica y se asocian a la expresión de marcadores de células madre tumorales (Cheng et al., 2009).

4.2) B- La formación de esferoides es independiente de E-Cadherina

Para poder discriminar si el aumento en la capacidad de agregación se debe a un aumento en la expresión de proteínas involucradas en la adhesión célula-célula, como por ejemplo E-Cadherina, realizamos un ensayo de adhesión dependiente de Cadherina a corto plazo. Para ello las células fueron tripsinizadas con una solución 0.01% tripsina+1mM CaCl. Esta solución degrada selectivamente las integrinas dejando activas las Cadherinas, tras lo cual las células fueron colocadas en placa de 24 posillos en medio DMEM sin SFB y agregadas en un agitador a 120 RPM en presencia de: 1) Ca 2mM, 2) 1mM EDTA (inhibe las Cadherinas) y 3) anti-E-Cadherina, durante 2h. (Figura31)

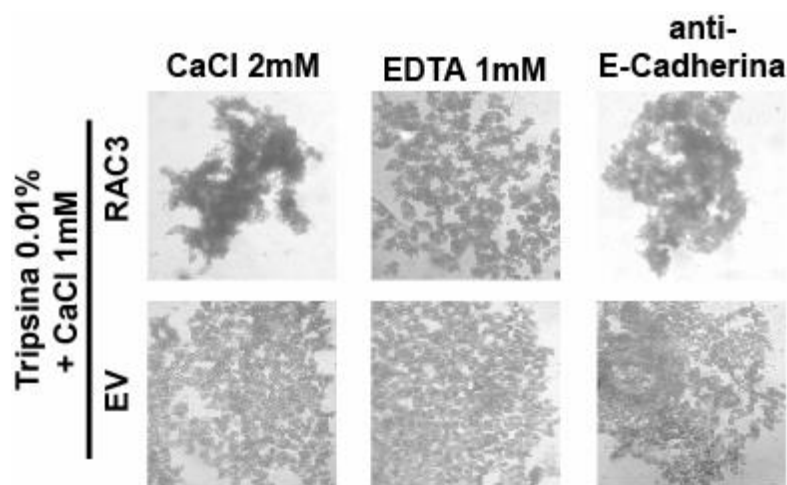


Figura 31: Adhesión dependiente de E-Cadherina. Células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o con niveles endógenos (EV) de RAC3 fueron tratadas con una solución de tripsina 0.01%+CaCl 1mM, lo cual asegura la degradación selectiva de integrinas y otras moléculas de adhesión, mientras que preserva las Cadherinas. Las células fueron incubadas a 37°C y a 120 RMP en 3 condiciones distintas: Medio+CaCl 2mM (control positivo), Medio+EDTA 1 mM (control negativo), Medio+ Anti-E-Cadherina (une al dominio extracelular). La agregación se dejó proceder por 2hs tras lo cual la capacidad de agregación fue fotografiada a una magnitud 20X

Los resultados revelan que el aumento en la capacidad de agregación de células con alto RAC3 es independiente de la expresión de Cadherinas, ya que cuando se inhiben selectivamente las integrinas, las células con alto RAC3 son incapaces de agregar.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la sobreexpresión de RAC3 estaría disminuyendo los niveles de Cadherina ya que las células control (EV) son capaces de agregarse en medio con Ca 2mM y esta agregación es totalmente inhibida en presencia de EDTA y parcialmente inhibida cuando se bloquea E-Cadherina con el anticuerpo específico. Por el contrario las células que sobre-expresan RAC3 no tienen

la capacidad de agregar, indicando que la sobreexpresión de RAC3 estaría disminuyendo los niveles de E-Cadherina. La sobre-expresión de RAC3 favorece la adhesión.

Dado que la capacidad de agregación que muestran las células con alto RAC3 es independiente de la expresión de Cadherinas, se investigó si la sobreexpresión de RAC3 estaría favoreciendo la expresión de proteínas de unión a matriz extracelular. Para ello células con alto o bajo RAC3 fueron cultivadas en placas de 24 posillos durante 2 hs, tras lo cual se procedió a eliminar por aspiración todas aquellas células que no se adhirieron a la placa. Las células adheridas fueron teñidas con cristal violeta y contadas (Figura 32).

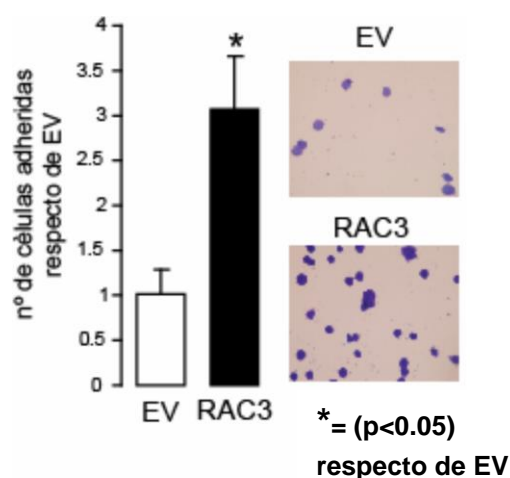


Figura 32: La sobreexpresión de RAC3 aumenta la capacidad de adhesión. Células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o con niveles endógenos (EV) de RAC3 fueron tratadas con tripsina, colocadas en placa y cultivadas en estufa a 37°C 5%CO₂, en medio DMEN durante 2hs. Luego las células que no adhirieron a la placa fueron retiradas por succión y las células adheridas fueron fijadas, teñidas con cristal violeta y fotografiadas en campo claro a una magnitud 40X. Las barras representan la media del número de células adheridas \pm SD de tres experimentos independientes (T-test).

Los resultados revelan que la sobreexpresión de RAC3 induce un aumento significativo en la capacidad de adhesión a placa, lo cual estaría íntimamente relacionado con la expresión de moléculas de adhesión a la matriz extracelular.

El hecho de que la sobreexpresión de RAC3 en células HEK293 promueve la formación de esferoides compactos a corto plazo; que esta capacidad es independiente de la expresión de E-Cadherina y que aumenta la capacidad de adhesión, sugiere que las células HEK293 sobre-expresando RAC3 han sufrido una transformación hacia un fenotipo mesenquimático menos diferenciado, lo cual, como se ha descripto en la introducción, es una característica necesaria para la adquisición de un fenotipo invasivo.

4.2) C- La formación de esferoides activa NF- κ B

El hecho de que la sobreexpresión de RAC3 favorece la formación de esferoides compactos independiente de Cadherinas y que hay un aumento en la capacidad de adhesión, sugiere que la sobreexpresión de RAC3 podría estar favoreciendo, además, la expresión de proteínas de matriz extracelular.

Ha sido demostrado que la unión de moléculas de adhesión a matriz extracelular a sus ligandos disparan cascadas de transducción de señales que acompañan el proceso invasivo y la autorenovación de células madre tumorales (Oskarsson et al., 2014). Dado que NF- κ B puede ser activado por la unión de CD44 a ácido hialurónico (Bourguignon et al., 2009a; Bourguignon et al., 2009b) o por unión de integrinas a Fibronectina (Klein et al., 2002; Qwarnstrom et al., 1994) componentes clave del nicho stem cell, que a su vez son genes blanco de NF- κ B. , Decidimos entonces investigar si la formación de esferoides compactos por sobreexpresión de RAC3, podría estar aumentando la actividad de NF- κ B. Para ello, células HEK293 sobre-expresando RAC3 (RAC3) o no (EV) fueron transfectados con el plásmido reportero κ B-Luc o en combinación con el inhibidor constitutivo de NF- κ B el I κ Bss, tras lo cual las células fueron cultivadas en suspensión (esferoide) o en adhesión (monocapa), luego de 24hs se midió la actividad κ B-Luc como se describe en materiales y métodos (Figura 33).

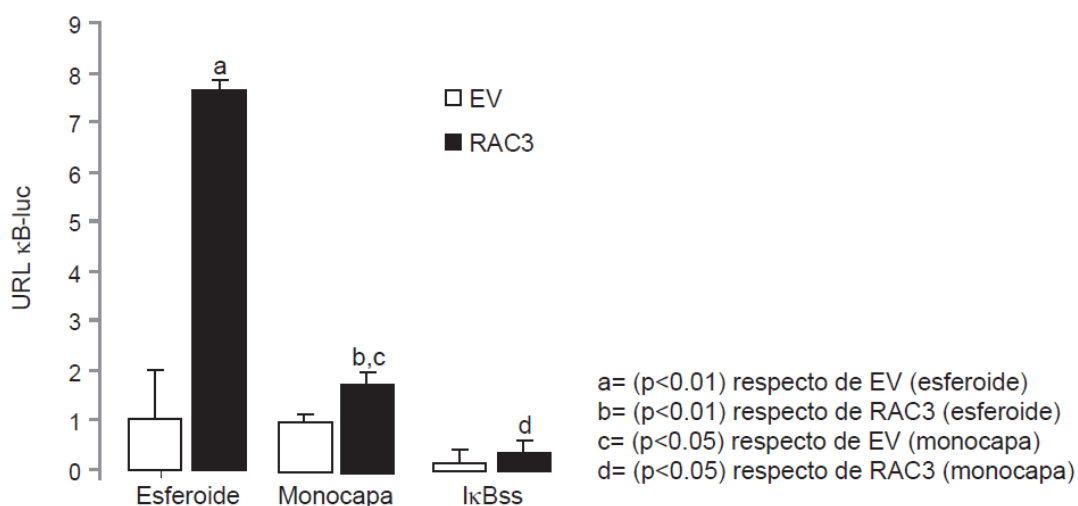


Figura 33: Actividad NF- κ B en esferoides. Células HEK293 sobre-expresando RAC3 (RAC3) o no (EV) fueron transfectados con el plásmido reportero κ B-Luc o en combinación con el inhibidor constitutivo de NF- κ B el I κ Bss, tras lo cual las células fueron cultivadas en suspensión (esferoide) o en adhesión (monocapa), luego de 24hs se midió la actividad κ B-Luc como se describe en materiales y métodos. Las barras representan la media de tres experimentos independientes (ANOVA, Tukey).

Como se observa en la figura la formación de esferoides compactos, inducida por sobreexpresión de RAC3, causa un aumento significativo de la actividad de NF- κ B comparado con las células en monocapa, indicando que el aumento en las interacciones célula-célula o célula matriz extracelular que favorecen a la formación de esferoides, contribuyen a la activación de NF- κ B.

4.3- La sobreexpresión de RAC3 induce la expresión de un fenotipo mesenquimático

Las células madre tumorales, exhiben un fenotipo mesenquimático el cual es regulado por mecanismos epigenómicos que involucran la expresión de proteínas como Vimentina (típico marcador mesenquimático) y de represores transcripcionales de E-Cadherina como SNAIL, Slug, Twist, siendo todos ellos blanco de la actividad de factores de transcripción como NF- κ B, TCF, STAT3, entre otros. Además, las células con características mesenquimáticas, exhiben un notable cambio morfológico, con células más ahusadas, disminución de la interacción con células vecinas y un marcado cambio a nivel del citoesqueleto.

Dado que la sobreexpresión de RAC3 resultó transformante en la capacidad proliferativa, se decidió investigar si además podía conferir a las células HEK293 las propiedades antes mencionadas y que frecuentemente se asocian a la expresión de un fenotipo de CMT. Para ello, a partir de extractos proteicos y de mRNA total de células originalmente no tumorales HEK293 con niveles normales endógenos de RAC3 (EV) o sobre-expresando RAC3 se analizaron los niveles de Vimentina y E-Cadherina por qPCR (Figura 35A) y WB (Figura 34B).

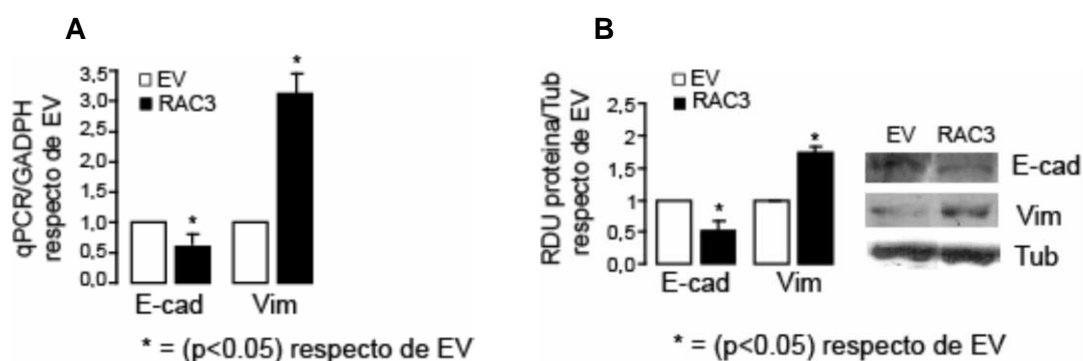


Figura 34: La sobreexpresión de RAC3 induce la expresión de un fenotipo mesenquimático: Se analizaron los niveles proteicos de E-Cadherina (E-Cad) y Vimentina (Vim) a partir de extractos provenientes de células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o con niveles endógenos (EV) de RAC3 por qPCR (A) y por WB (B). Las barras representan la media \pm SD de 3 experimentos independientes, (T-test).

Los resultados revelan que la sobreexpresión de RAC3 en células HEK293 induce un aumento significativo en los niveles de Vimentina y una disminución significativa en los niveles de E-Cadherina.

Estos resultados permiten concluir que la sobre-expresión de RAC3 induce transformación tumoral, además, a través de la de expresión diferencial de genes involucrados en TEM.

Además, se analizó por inmunofluorescencia la morfología de las fibras de actina y microtúbulos. La sobreexpresión de RAC3 causó rearrreglos a nivel de citoesqueleto con aumento en las fibras de actina y cambios en la disposición de los microtúbulos, en células HEK293 que sobre-expresa el coactivador (RAC3) (Figura 35A).

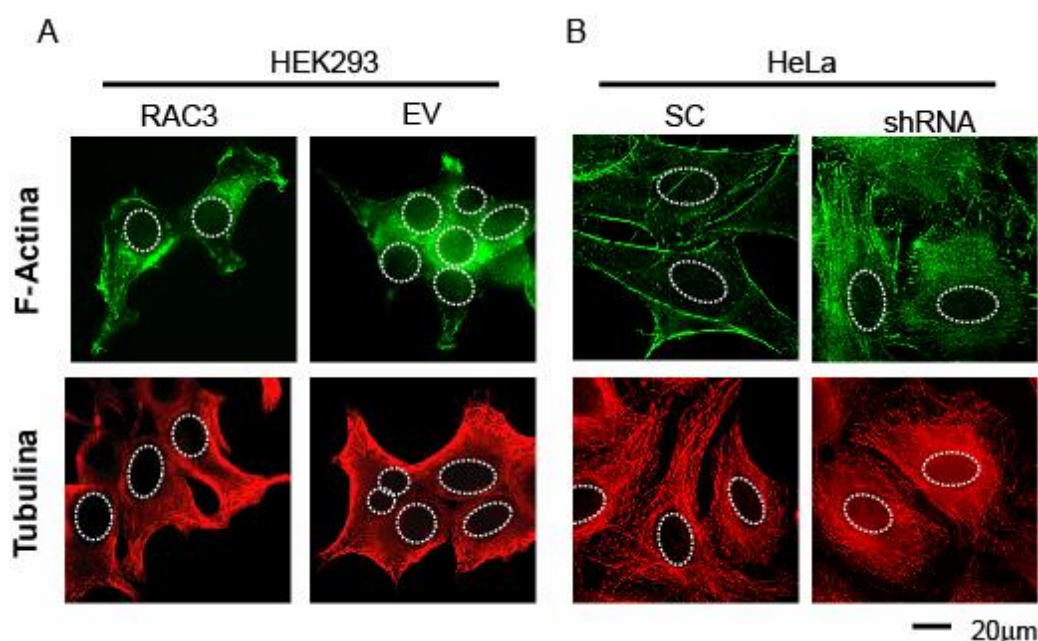


Figura 35: La sobreexpresión de RAC3 induce cambios en el citoesqueleto. Células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o no (EV) y células HeLa sobre-expresando (SC) o no (shRNA), fueron fijadas e incubadas con anti-Tubulina y secundario conjugado a rodamina (rojo) o con Faloidina para marcar las fibras de estrés (verde). Las delimitaciones en línea punteada indican la posición del núcleo. Las imágenes fueron tomadas utilizando un microscopio de fluorescencia a una magnitud 100X.

Por el contrario, cuando analizamos los mismos parámetros en las células tumorales HeLa que naturalmente sobre-expresan RAC3 (SC) y cuyos niveles fueron silenciados por transfección con un shRNA-RAC3 (shRNA), observamos el efecto contrario, una pérdida total en las fibras de actina y una disposición de microtúbulos concéntrica que frecuentemente se asocia a la morfología característica de una célula epitelial (Figura 35B).

Estos resultados demuestran que la sobreexpresión de RAC3 involucra cambios en el citoesqueleto de actina y Tubulina compatibles con el fenotipo de células altamente polarizadas.

Se analizó también el efecto de sobreexpresión de RAC3 sobre la los niveles y localización de Vimentina, típico marcador mesenquimático. Como se observa en la figura 36A, la sobreexpresión de RAC3 en células HEK293 (RAC3) indujo un notable aumento en los niveles de Vimentina comparada con el control (EV), y ésta localizó principalmente en las proyecciones citoplasmáticas. Por el contrario, como se observa en la figura 36B, cuando analizamos los niveles de Vimentina en células HeLa, las células que tenían silenciado RAC3 (shRNA) mostraron una notable disminución en los niveles de dicha proteína comparada con el control (SC).

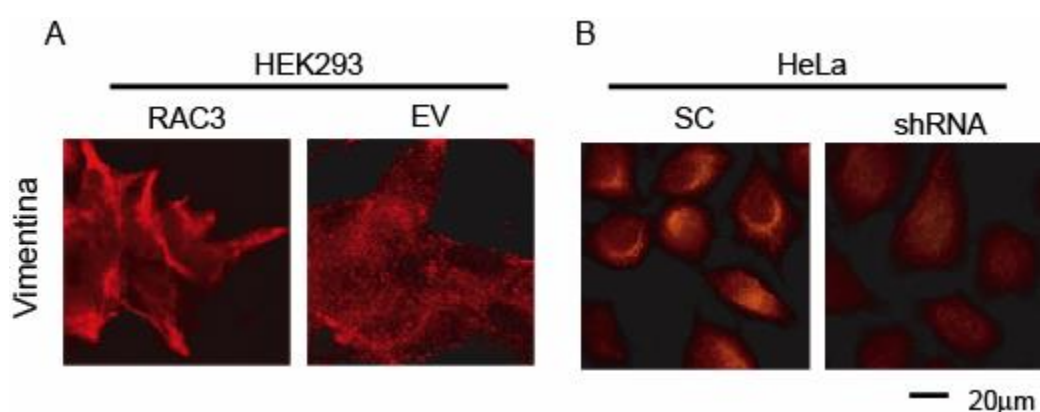


Figura 36: La sobreexpresión de RAC3 induce un fenotipo mesenquimático. Células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o no (EV) y células HeLa sobre-expresando (SC) o no (shRNA), fueron fijadas e incubadas con anti-Vimentina y secundario conjugado a rodamina (rojo). Las imágenes fueron tomadas utilizando un microscopio de fluorescencia a una magnitud 100X.

Estos resultados revelan que la sobreexpresión de RAC3 está asociada a la expresión de marcadores mesenquimáticos como Vimentina.

Por otro lado, analizamos la localización subcelular de la proteína β -Catenina. Como se explicó en la introducción, β -Catenina se encuentra asociada a la proteína E-Cadherina, la cual, cuando está presente secuestra a β -Catenina en las uniones adherentes célula-célula mediada por Cadherinas. Sin embargo, la pérdida de E-Cadherina, que frecuentemente acompaña la adquisición de un fenotipo mesenquimático, induce liberación de β -Catenina que puede ahora ser degradada o estabilizada. Como se observa en la figura 37A, la sobreexpresión de RAC3 en la línea HEK293 (RAC3) induce la deslocalización de β -Catenina a nivel de la membrana plasmática, comparado con su control (EV) donde β -Catenina se encuentra estrechamente asociada a la membrana. Por el contrario, como se observa en la figura

37B, el silenciamiento de RAC3 en la línea HeLa mediante un shRNA-RAC3 (shRAC3) induce un marcado aumento en la localización de β -Catenina a nivel de la membrana plasmática, comparado con su control (SC) donde localiza preferentemente en el citoplasma.

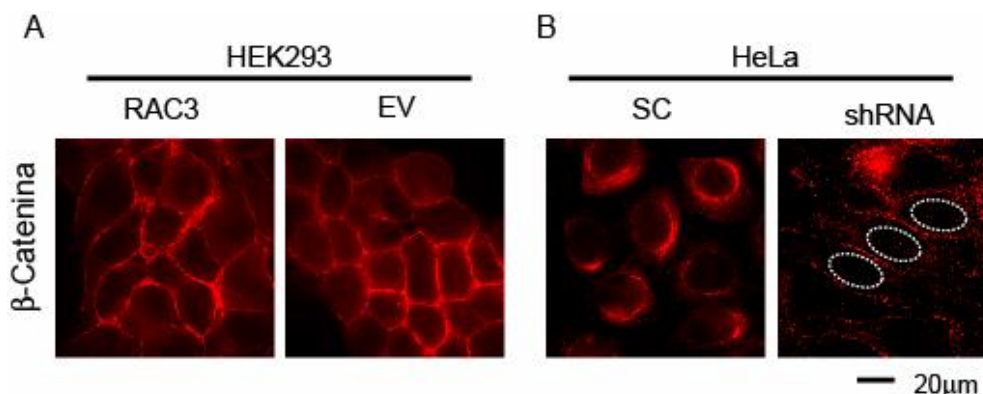


Figura 37: La sobreexpresión de RAC3 induce deslocalización de β -Catenina a nivel de membrana plasmática. Células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o no (EV) y células HeLa sobre-expresando (SC) o no (shRNA), fueron fijadas e incubadas con anti- β -Catenina y secundario conjugado a rodamina (rojo) la línea punteada representa la posición del núcleo. Las imágenes fueron tomadas utilizando un microscopio de fluorescencia a una magnitud 100X.

De acuerdo a estos resultados, la sobreexpresión de RAC3 estaría favoreciendo el aumento de β -Catenina en el pool citoplasmático como consecuencia, quizá, de la disminución de E-Cadherina en membrana.

Estos resultados nos permiten concluir que la sobreexpresión de RAC3 confiere a la línea celular HEK293 un fenotipo altamente mesenquimático compatible al fenotipo encontrado en CMT.

4.4- La sobreexpresión de RAC3 aumenta la capacidad migratoria e invasiva

La adquisición de un fenotipo mesenquimático se asocia al aumento en la motilidad celular, requerida para llevar a cabo el proceso metastásico y que ha sido asociado a las CMT ya que son las que tienen la capacidad de regenerar el tumor. Los efectos de sobreexpresión de RAC3 sobre la expresión de CD44, involucrado en la metástasis de células tumorales y la transición hacia un fenotipo menos diferenciado, permiten hipotetizar que una sobreexpresión de RAC3

probablemente podría estar induciendo la motilidad e invasión de esta línea celular.

4.4) A- La sobreexpresión de RAC3 aumenta la capacidad migratoria

Se analizó la capacidad migratoria, la actividad de MMP2 y la capacidad invasiva de células HEK293 sobre-expresando RAC3. Como se observa en la figura 38. cuando sobre-expresamos RAC3 en células HEK293 se produce un aumento en la capacidad migratoria

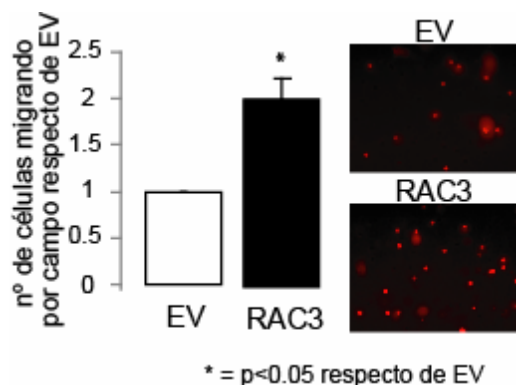


Figura 38: La sobreexpresión de RAC3 aumenta la capacidad migratoria. Células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o con niveles endógenos (EV) de RAC3 fueron colocadas en la parte superior de un transwell con membrana de 8 μ m en 100 ml medio DMEN+0.1% BSA, en ausencia de SFB. En la parte inferior del transwell se colocó DMEN+SFB como quimioattractante. Luego de 16 hs, las células que no migraron fueron retiradas y las células que migraron fueron fijadas, y teñidas con *gel red*. Las barras representan la media del número de células que migraron \pm SD de tres experimentos independientes (T-test).

Además analizamos la capacidad migratoria por la técnica de cicatrización de la herida, tanto en células HEK293 sobre-expresando RAC3 (RAC3) y en las líneas celulares tumorales HeLa y T47D que naturalmente lo sobre-expresan (SC) y en células HEK293 expresando niveles endógenos (EV) o silenciado en células tumorales shRNA (Figura 39).

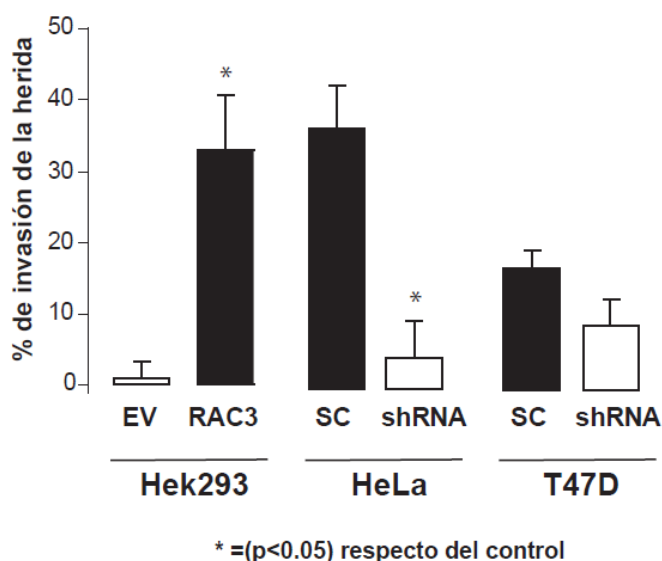


Figura 39: La sobreexpresión de RAC3 es necesaria para la migración. La migración se analizó en células HEK293, HeLa y T47D con altos (RAC3 o SC) niveles de RAC3 o con niveles endógenos o silenciados (EV o shRNA) mediante la técnica de cicatrización de la herida, como se describe en materiales y métodos. Las barras representan la media \pm SD de tres experimentos independientes (T-test)

4.4) B- La sobreexpresión de RAC3 induce la actividad MMP2

El análisis de la actividad de MMP2 por zimografía indica que cuando sobre-expresamos RAC3 en células HEK293 se induce significativamente la actividad gelatinolítica de MMP2.

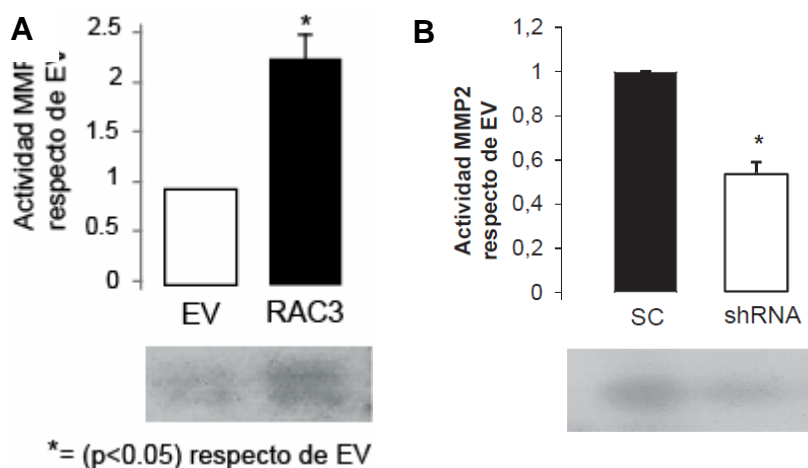


Figura 40: La sobreexpresión de RAC3 induce la actividad de MMP2. Células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o con niveles endógenos (EV) de RAC3 (A) y células T47D con niveles endógenos (SC) o silenciados (shRNA), fueron crecidas a confluencia tras lo cual el medio fue reemplazado por medio DMEN sin SFB y se volvieron a incubar por 24 hs. La actividad MMP2 se analizó por zimografía a partir de los medios condicionados obtenidos en cada condición, como se describe en materiales y métodos. Las barras representan la media de la actividad MMP2 \pm SD de tres experimentos independientes (T-test).

Por el contrario, el silenciamiento de RAC3 en la línea T47D inhibe la actividad MMP2. Con lo que se podría concluir que la sobreexpresión de RAC3 es necesaria para la actividad de MMP2.

4.4) C- La sobreexpresión de RAC3 aumenta la capacidad invasiva

Por último y en correlación con todo lo antes observado, decidimos investigar si la sobreexpresión de RAC3 induce un aumento en la capacidad invasiva. Para ello analizamos la capacidad invasiva de células HEK293 sobre-expresando RAC3 (RAC3) o no (EV), por medio de la técnica de transwell impregnados con matrigel. Como podemos observar y en concordancia con todo lo antes mencionado, la sola sobreexpresión de RAC3 en células HEK293 causa un aumento significativo en la capacidad invasiva. Por el contrario células T47D shRNA muestran una notable inhibición en dicha capacidad.

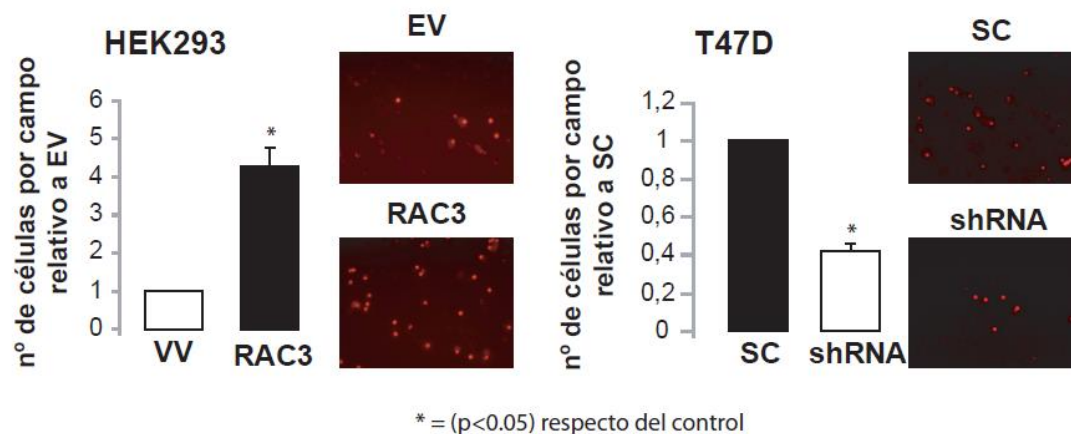


Figura 41: La sobreexpresión de RAC3 aumenta la capacidad invasiva. Células HEK293 o T47D sobre-expresando (RAC3/ SC) o con niveles endógenos o silenciados (EV /shRNA) de RAC3 fueron colocadas en la parte superior de un transwell con membrana de 8 μ m impregnado con matrigel, en 100 μ l medio DMEN+0.1% BSA, en ausencia de SFB. En la parte inferior del transwell se colocó DMEN+SFB como quimioattractante. La invasión se dejó proceder durante 16 hs, tras lo cual las células que no invadieron fueron retiradas de la parte superior del transwell y las células que lograron invadir, fueron fijadas y teñidas con *gel red*. Las barras representan la media del número de células que invadieron \pm SD de tres experimentos independientes (T-test).

Estos resultados nos permiten concluir que la sobreexpresión de RAC3 induce transformación tumoral con la adquisición de un comportamiento invasivo, que incluye aumento en la capacidad migratoria, aumento en la actividad de MMP2 y como consecuencia de la capacidad invasiva.

Parte II

4.5- Rol de RAC3 en la senescencia celular

Una característica notable de las CMT, al igual que las células stem embrionarias es la capacidad ilimitada de replicación.

Brevemente y tal como se describió en la introducción de esta tesis, si bien las células madre embrionarias y las células tumorales mantienen activa la telomerasa, en el caso de las células normales diferenciadas no ocurre y en cada ciclo de división celular se produce un acortamiento telomérico hasta una situación de crisis en la cual se produce el arresto irreversible del ciclo celular y es lo que se conoce como senescencia replicativa. Pero, sin embargo existen otras señales que pueden disparar senescencia, tales como el acúmulo de mutaciones, daño genómico inducido por distintas señales genotóxicas o activación de genes supresores de ciclo celular y es lo que se conoce como senescencia prematura.

Aquellas señales o proteínas que impidan la entrada en senescencia de células con DNA dañado podrían favorecer la transformación tumoral. De acuerdo a estos conceptos y todos los resultados obtenidos, se decidió investigar si la sobreexpresión de RAC3 podría tener algún efecto sobre la senescencia prematura inducida por estrés genotóxico o metabólico utilizando H_2O_2 o Rapamicina, respectivamente. Además investigamos el rol de RAC3 en el mantenimiento de la actividad telomerasa, enzima estrictamente involucrada en la inmortalidad celular.

4.5) A- El tratamiento con H_2O_2 y Rapamicina inducen senescencia prematura en células HEK293

Como fue descrito en la introducción, la proteína mTOR está involucrada en el control del crecimiento y metabolismo y es blanco de Rapamicina la cual inhibe el complejo mTOR impidiendo su activación. En cuanto al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) dependiendo de la concentración y el tipo celular puede inducir apoptosis, autofagia o senescencia. Por tal motivo, en primer lugar analizamos las dosis y el tiempo de tratamiento requerido para inducir senescencia con cada uno de estos estímulos. En primer lugar, con el objetivo de determinar la concentración optima para inducir estrés genotóxico o metabólico analizamos el efecto de concentraciones crecientes de H_2O_2 (0, 75, 150 y 250 μM) o Rapamicina (0, 25, 50, 100 nM) sobre el número de células a los 6 días post-estimulo.

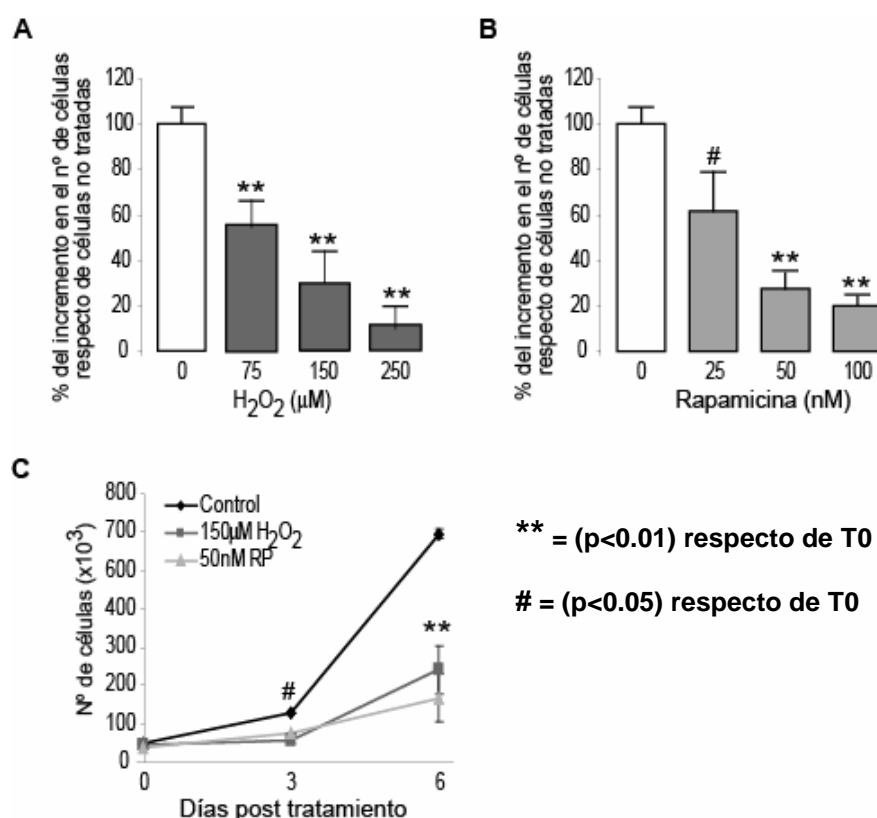


Figura 42: Determinación de la dosis óptima de H₂O₂ y Rapamicina. Se determinó el número de células HEK293 luego de la exposición a dosis crecientes de H₂O₂ (A) y Rapamicina (B) las barras representan la media \pm SD de tres experimentos independientes (ANOVA, Tukey). Análisis de la capacidad proliferativa en presencia de las dosis óptimas, 150 μM de H₂O₂ y 50 nM de Rapamicina a los 3 y 6 días post tratamiento, como se describe en materiales y métodos (ANOVA, Tukey).

Como se muestra en las figuras, todas las concentraciones utilizadas de H₂O₂ (Figura 43A) o Rapamicina (Figura 42B) fueron capaces de reducir la capacidad proliferativa de células HEK293 comparado con las células control sin estímulo. La dosis intermedia en cada caso (150 μM y 50 nM de H₂O₂ o Rapamicina respectivamente), fue capaz de generar el efecto esperado: inhibición de aumento en el número de células manteniéndose relativamente constante. Analizamos entonces la capacidad proliferativa a los 3 o 6 días post tratamiento. Luego de 3 días de cultivo en ausencia de tratamiento la cantidad de células se mantuvo más o menos similar al tiempo de partida, con un pequeño incremento al día 6 y significativamente diferente al crecimiento de las células control (Figura 43C).

La disminución en el número de células por tratamiento con cada uno de estos estímulos no fue debido a la inducción de apoptosis, lo cual fue claramente demostrado no solo por la ausencia de activación de procaspasa-3 (Figura 44A), sino también que no se observaron cambios en la viabilidad celular utilizando tinción de exclusión (Figura 43A). Sin embargo, se pudo observar claramente el incremento del marcador de senescencia p21 (Figura 43B).

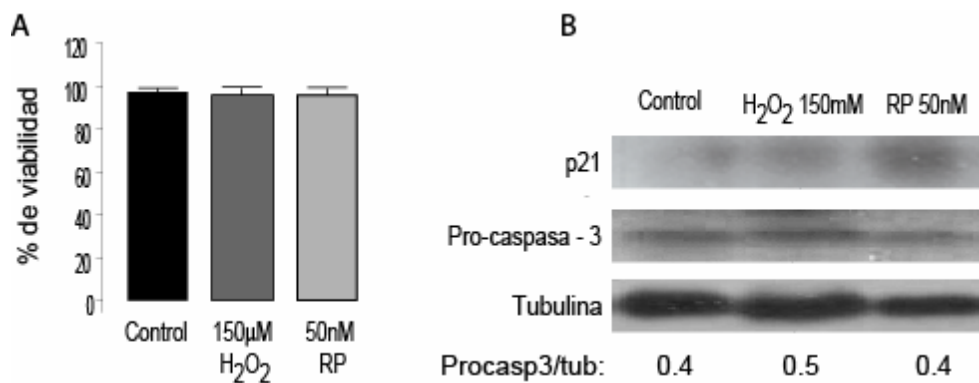


Figura 43: Las dosis de H₂O₂ y Rapamicina no generan apoptosis. Análisis de la viabilidad celular en la línea HEK293 por tinción con azul de tripan luego del estímulo con H₂O₂ 150µM y Rapamicina 50 nM (A). Análisis por WB de los niveles de Pro-caspasa 3 y p21 en la línea HEK293 luego del estímulo con H₂O₂ 150µM y Rapamicina 50 nM (B).

Se analizaron los típicos marcadores de senescencia como núcleos grandes y la inducción de actividad β-Galactosidasa ácida, asociada a senescencia (SA β -Gal +). Como podemos observar tanto las imágenes como el diagrama de barras claramente muestran un incremento significativo de células con núcleos grandes heterocromáticos (Figura 44A) y un gran contenido de células con actividad SA-β -Gal (Figura 44B) luego de los 6 días del tratamiento con H₂O₂ o Rapamicina.

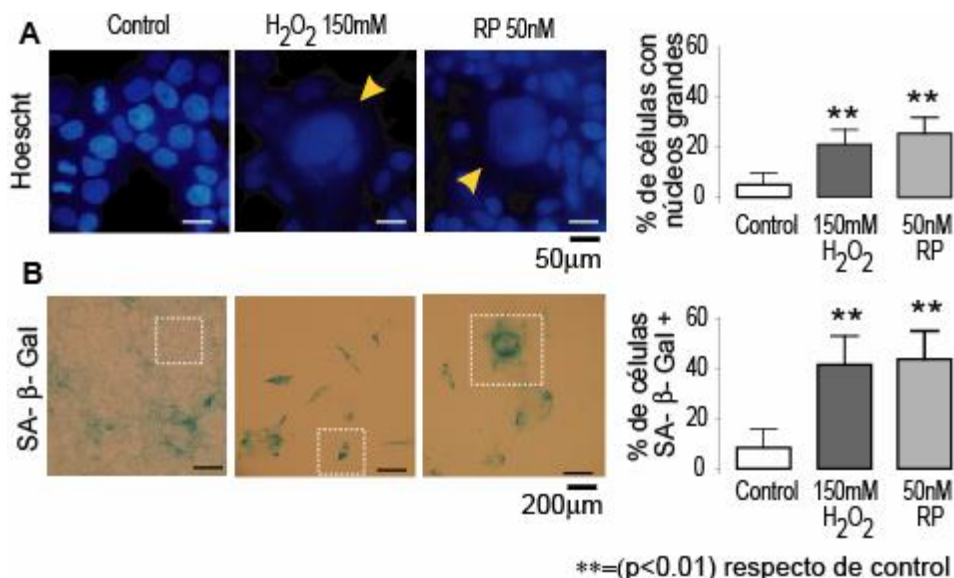


Figura 44: Las dosis de H₂O₂ y Rapamicina generan senescencia en la línea HEK293. Análisis de marcadores típicos de senescencia en la línea HEK293, núcleos grandes (A) y actividad SA-β -Gal luego del estímulo con H₂O₂ 150µM y Rapamicina 50 nM, como se describe en materiales y métodos. Las barras representan la media ±SD del porcentaje de núcleos grande y actividad SA-β -Gal, de tres experimentos independientes (ANOVA, Tukey)

4.5) B- La concentración de H₂O₂ y Rapamicina utilizadas inducen un arresto en fase G1 del ciclo celular

Todos estos resultados correlacionan con los resultados obtenidos a partir del análisis del ciclo celular por cartometría de flujo, donde el tratamiento con H₂O₂ o Rapamicina inducen un incremento de células arrestadas en fase G1 del ciclo celular.

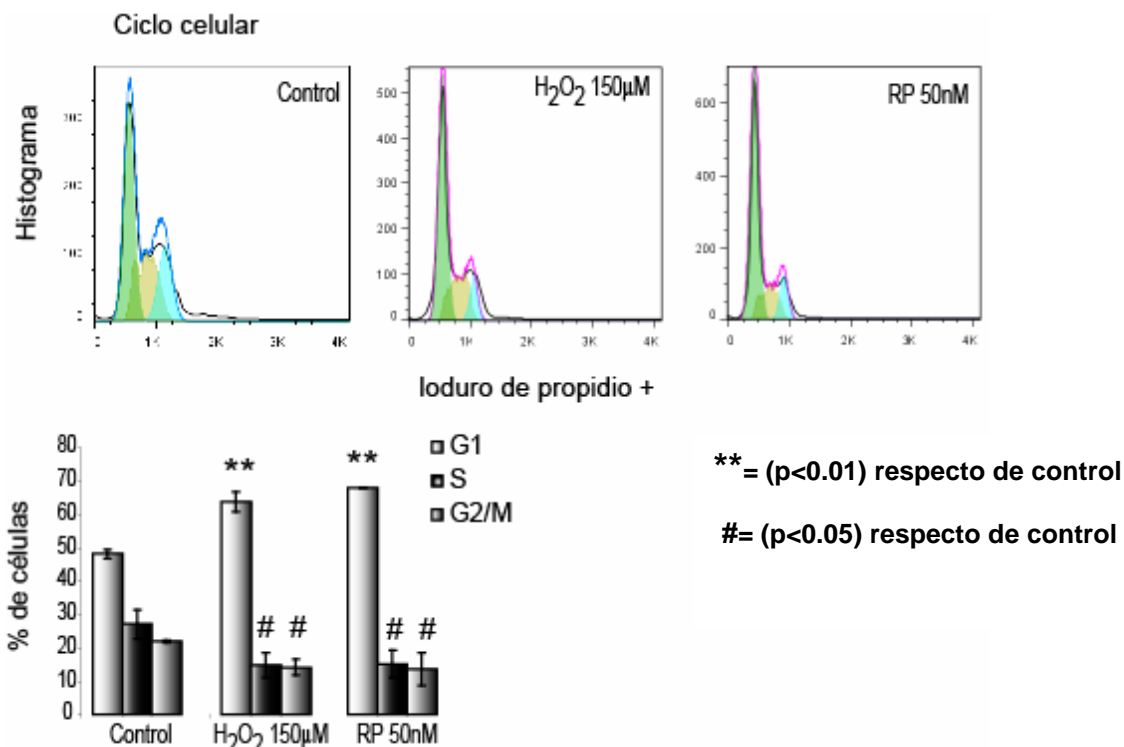


Figura 45: La dosis H₂O₂ 150μM y Rapamicina 50 nM producen el arresto en fase G1 del ciclo celular. Histograma del análisis de ciclo celular en la línea HEK293 por cartometría de flujo, por tinción con ioduro de propidio, luego del estímulo con H₂O₂ 150μM y Rapamicina (RP) 50 nM (panel superior). Las barras (panel inferior) representan la media ±SD del número de células en cada fase del ciclo celular. (ANOVA, Tukey)

Estos resultados nos permiten concluir que las dosis utilizadas son capaces de inducir senescencia prematura en células HEK293.

4.6- La sobreexpresión de RAC3 protege a las células HEK293 de la senescencia prematura

A continuación, se investigó el efecto de sobreexpresión de RAC3 sobre la inducción de senescencia inducida por estos estímulos. Se observó que la sobreexpresión de RAC3 causa una disminución significativa de células con núcleos

heterocromáticos grandes y células con actividad SA β -Gal cuando son inducidas con H_2O_2 (Figura 46A) o Rapamicina (Figura 46B).

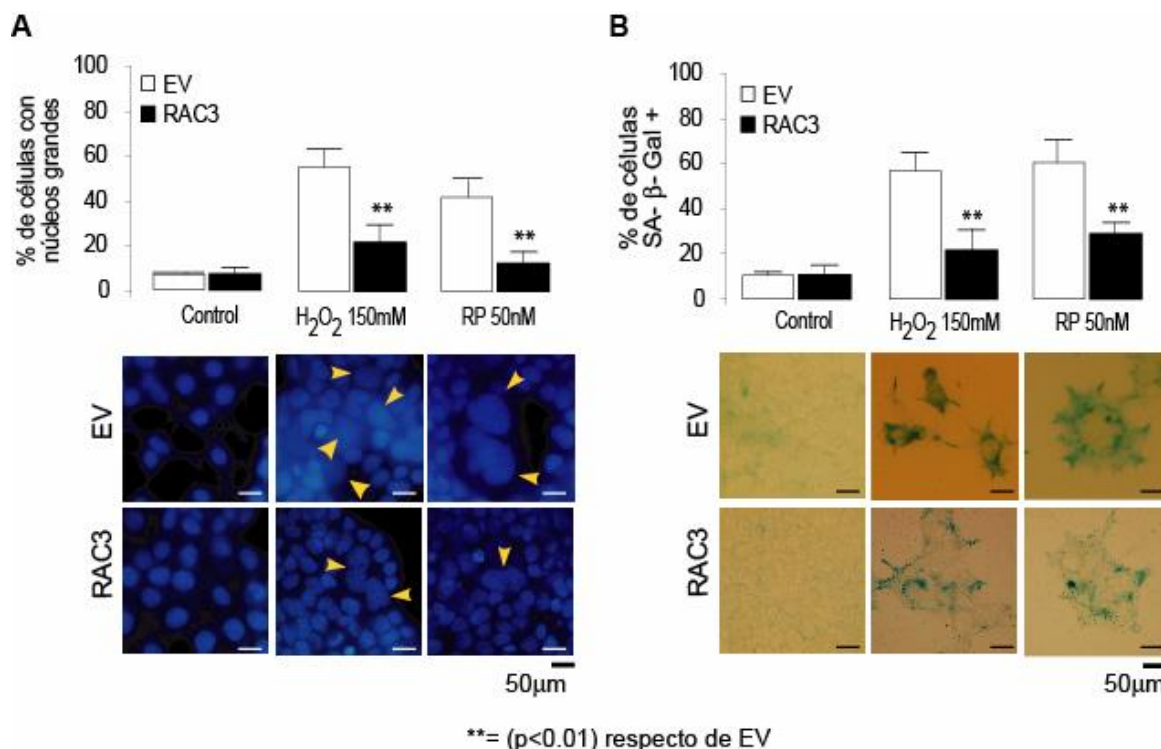


Figura 46: La sobreexpresión de RAC3 inhibe la senescencia prematura. Como se describe en materiales y métodos, células HEK293 con alto (RAC3) o bajo (EV) RAC3, fueron estimuladas con H_2O_2 150 mM o Rapamicina 50 nM (RP) por 24 hs. A los 6 días post tratamiento se analizó la aparición de núcleos grandes y la actividad β -Gal ácida, marcadores típicos de senescencia. Las barras representan la media \pm SD de tres experimentos independientes (ANOVA, Tukey).

4.6) A- La sobreexpresión de RAC3 inhibe la expresión de p21 inducida por H_2O_2 o Rapamicina

Para confirmar esta acción anti-senescente se analizó además el efecto de sobreexpresión de RAC3 sobre los niveles de la proteína supresora de ciclo celular p21 (Figura 47). Como se muestra en la figura, en correlación con los resultados arriba descriptos, si bien los distintos estímulos causan un aumento significativo en los niveles de p21, dicho efecto es completamente bloqueado cuando RAC3 se encuentra sobreexpresado.

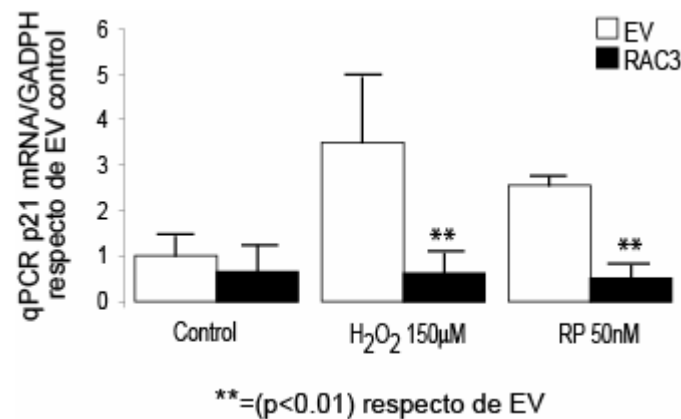


Figura 47: La expresión de p21 inducida por senescencia prematura es bloqueada por la sobreexpresión de RAC3. Como se describe en materiales y métodos, células HEK293 con alto (RAC3) o bajo (EV) RAC3 fueron estimuladas con H₂O₂ 150 µM o Rapamicina 50 nM (RP) A los 6 días post tratamiento se analizó por qPCR los niveles de expresión de p21. Las barras representan la media ±SD de tres experimentos independientes, (T-test).

4.6) B- La sobreexpresión de RAC3 inhibe la translocación de p21 y p16 a núcleo

Resultados similares se obtuvieron cuando se investigaron los cambios en expresión y localización de los otros supresores de ciclo p21 y p16. Si bien, el tratamiento con Rapamicina indujo el aumento en los niveles de P21 y P16 dicho efecto es totalmente bloqueado cuando RAC3 se encuentra sobreexpresado (Figura 48).

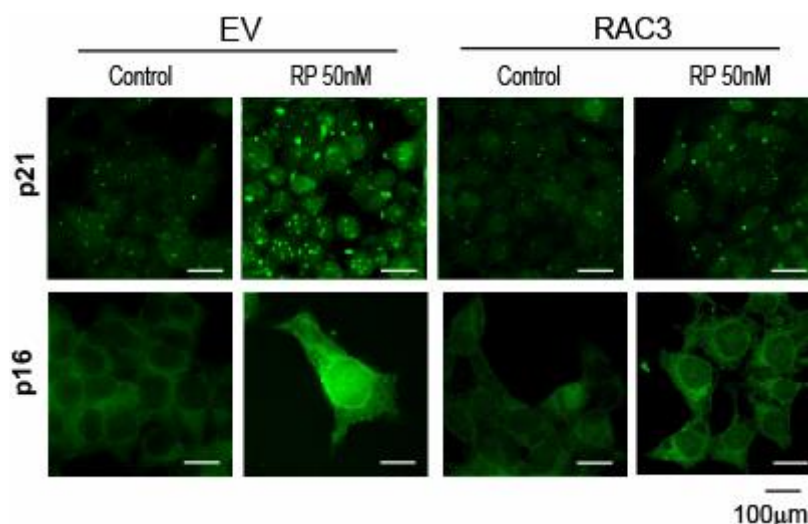


Figura 48: La sobreexpresión de RAC3 inhibe la translocación de p21 y p16 a núcleo. Como se describe en materiales y métodos, células HEK293 con alto (RAC3) o bajo (EV) RAC3, fueron estimuladas Rapamicina 50 nM (RP) por 24 hs. A los 6 días post tratamiento se analizó la aparición por inmunofluorescencia los niveles y localización subcelular de las proteínas supresoras de ciclo p21 y p16.

4.6) C- La sobreexpresión de RAC3 inhibe la translocación de p53 a núcleo

Cuando se analizó la expresión de p53 observamos que, en primer lugar la sobreexpresión de RAC3 no causa una disminución significativa en los niveles totales de proteína como fue observado para el caso de p21 y p16 ya sea en condición control como bajo los tratamientos con H₂O₂ o Rapamicina (Figura 49A). Sin embargo, pudo observarse que cuando RAC3 está sobreexpresado los niveles de p53 son predominantemente citoplasmáticos tanto en presencia como ausencia de estímulos.

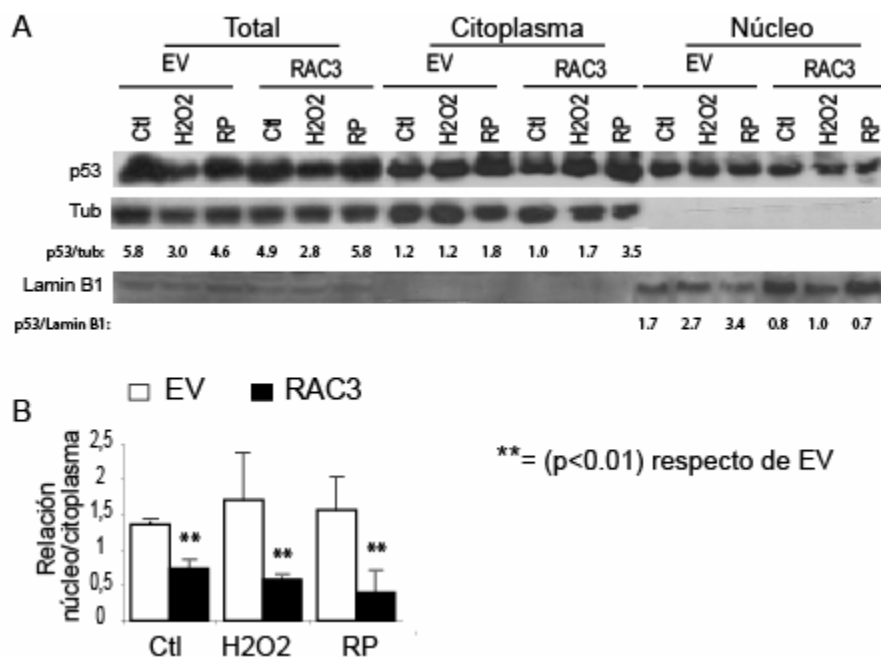


Figura 49: La sobreexpresión de RAC3 inhibe la translocación de p53 bajo estímulo genotóxico. Como se describe en materiales y métodos, células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o con niveles endógenos (EV) RAC3, fueron estimuladas con H₂O₂ 150 mM o Rapamicina 50 nM (RP) por 24 hs. A los 6 días post tratamiento se realizó un fraccionamiento subcelular y se analizó por WB los niveles de p53 que fueron relativizados a los niveles de Tubulina en la fracción citoplasmática y a lámina B1 en la fracción nuclear (A). Las barras representan la media de la relación núcleo/citoplasma \pm SD de tres experimentos independientes, (T-test).

Estos resultados fueron corroborados por IF. Como se muestra en la figura 50, el estímulo con Rapamicina causa un aumento en la translocación de p53 al núcleo, sin embargo, dicho efecto es totalmente bloqueado cuando RAC3 se encuentra sobreexpresado.

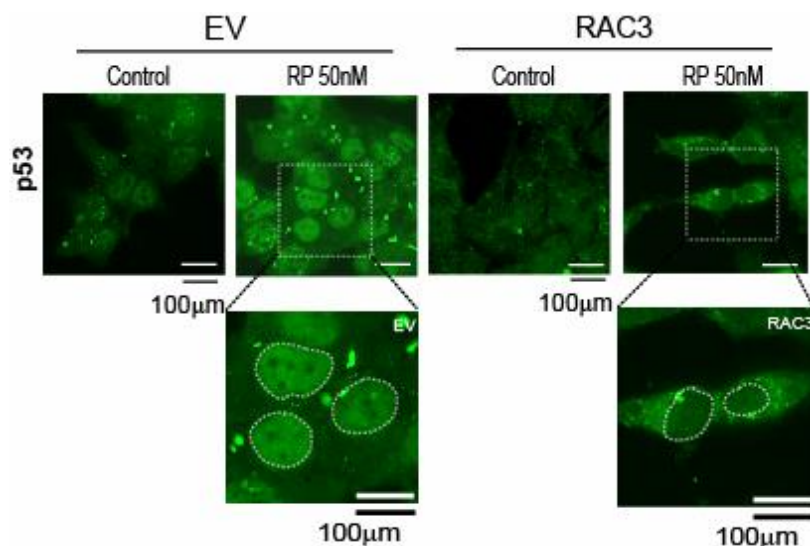


Figura 50: La sobreexpresión de RAC3 inhibe la translocación de p53 bajo estímulo genotóxico. Como se describe en materiales y métodos, células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o con niveles endógenos (EV) RAC3, fueron estimuladas con Rapamicina 50 nM (RP) por 24 hs. A los 6 días post tratamiento se analizó por IF la localización subcelular de p53.

De este modo la inhibición de la ruta p53 o p53-p21 podría ser el mecanismo por el cual la sobreexpresión de RAC3 es capaz de inhibir la senescencia inducida por estrés genotóxico o metabólico.

4.7- La sobreexpresión de RAC3 es necesaria para la proliferación y el mantenimiento de la actividad telomerasa en células tumorales

Como se mencionó, algunos trabajos recientes han demostrado que la expresión de RAC3 es necesaria para mantener la pluripotencia y la autorenovación de células madre (Percharde and Azuara, 2012; Percharde et al., 2012) La pérdida de expresión de RAC3 está asociada a la diferenciación de células madre hacia un fenotipo maduro (Percharde et al., 2012) donde la actividad telomerasa es silenciada. Además, una sobreexpresión de RAC3 conjuntamente con una telomerasa activa, en forma simultánea son características usualmente encontradas sólo en células madre y tumores, pero no en tejidos maduros normales, sugiriendo una probable asociación entre ambas moléculas en cuanto a la inhibición de la senescencia. En línea con este razonamiento, se decidió investigar si la sobreexpresión de RAC3 podría ser un factor

requerido para mantener el potencial replicativo de células tumorales afectando la actividad telomerasa. Para estos experimentos utilizamos la línea celular tumoral HeLa que naturalmente sobre-expresa RAC3, tiene una elevada actividad telomerasa y es incapaz de ingresar en senescencia replicativa. Como se describe en materiales y métodos, con el objetivo de disminuir los niveles endógenos de RAC3, se generaron células HeLa RAC3 knock down por transfección con un shRNA específico para RAC3 (shRNA-RAC3) y células control, transfectadas con el vector control (SC) y se analizó la capacidad proliferativa, marcadores típicos de senescencia y la actividad telomerasa.

Encontramos que la disminución de los niveles de RAC3 mediante un shRNA-RAC3 (shRNA) en esta línea celular induce una disminución significativa en la capacidad proliferativa comparado con las células control (Figura 51A). Además, encontramos que la disminución en la capacidad replicativa está acompañada por un aumento en los marcadores de senescencia típicos como núcleos grandes y actividad SA- β -Gal positiva (figura 51B).

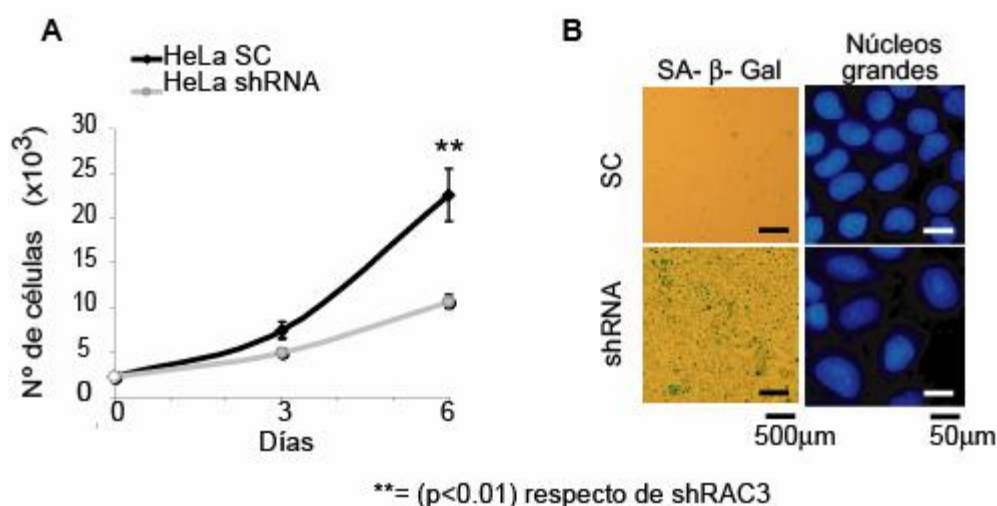


Figura 51: El silenciamiento de RAC3 tras sucesivos pasajes induce senescencia en células HeLa. Análisis de la proliferación de células HeLa control (SC) y células HeLa con la expresión de RAC3 silenciado mediante un shRNA-RAC3 (shRNA) a 3 y 6 días (A). Imágenes de la actividad SA: β -Gal y aparición de núcleos grandes en células HeLa SC y shRNA, como se describe en materiales y métodos.

Finalmente, se observó además una disminución en la actividad telomerasa constitutiva que naturalmente exhiben estas células cuando la expresión de RAC3 fue silenciada (Figura 52)

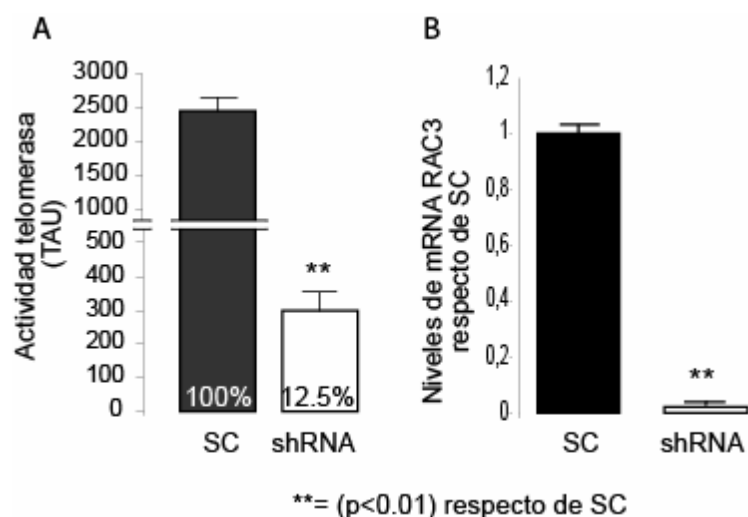


Figura 53: RAC 3 es un factor clave para el mantenimiento de la actividad telomerasa en células tumorales. Como se describe en materiales y métodos la actividad telomerasa fue medida en células HeLa control que sobre-expresan RAC3 (SC) o silenciado mediante shRNA-RAC3 (shRNA) mediante el ensayo SYBR Green RQ-TRAP (A). Niveles de RAC3 en células HeLa (B). Las barras representan la media \pm SD de tres experimentos independientes (T-Test)

Los resultados mostrados en los últimos apartados nos permiten concluir que la sobreexpresión de RAC3 favorece la proliferación celular y protege a las células de la senescencia prematura inducida por estrés genotóxico o metabólico. Más aún, podemos concluir que la sobreexpresión de RAC3 es necesaria para el mantenimiento de la actividad telomerasa en células tumorales, siendo todas estas características necesarias y complementarias a los eventos requeridos para la transformación de células no tumorales hacia un fenotipo tumoral.

4.8- Células originalmente no tumorales adquieren por sobreexpresión de RAC3 la capacidad de generar tumores *in vivo*

Si bien existen múltiples evidencias que permiten definir a RAC3 como un oncogén, aún no ha sido esclarecido qué tan tempranamente en la tumorigénesis se comienza a sobre-expresar y cómo ocurre. La oncogénesis involucra la participación de múltiples oncogenes y en general, la mutación de un solo proto-oncogén resulta insuficiente para el desarrollo completo de un tumor y que además reúna todas las características de malignidad. Sin embargo, de acuerdo con los resultados hasta aquí presentados obtenidos en esta tesis, la sola sobreexpresión de RAC3 en una línea

celular originalmente no tumoral produce un número de cambios y transformación compatible con la inducción de CMT, por lo tanto, se decidió investigarlo *in vivo*.

En estos experimentos, 2×10^6 células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o con niveles endógenos (EV) de RAC3, en 200 μ l de PBS fueron inyectadas en el flanco derecho de 6 ratones Nu/Nu machos de 5-6 semanas, por condición, como se describe en materiales y métodos.

Como se observa en la figura 54, 6/6 ratones inyectados con células HEK293 sobre-expresando RAC3 desarrollaron tumores con un volumen promedio de 60 mm^3 al día 8 post inyección, mientras que en los ratones inyectados con células control (EV) no desarrollaron tumor. Sin embargo, los tumores no pudieron persistir en el tiempo y su tamaño fue decreciendo gradualmente hasta que remitieron por completo al día 30 post inyección. .

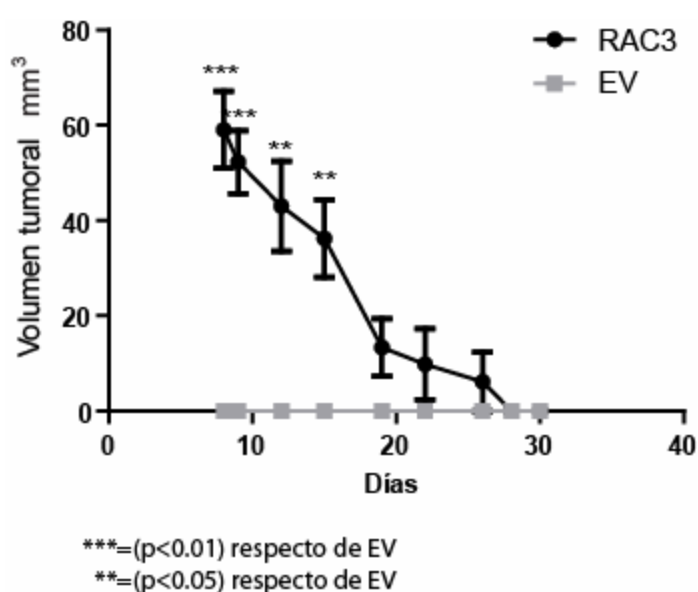


Figura 54: La sobreexpresión de RAC3 induce tumores *in vivo*. Para estos experimentos 2×10^6 células en 200 μ l de PBS fueron inyectadas en el flanco derecho de un total de 12 ratones Nu/Nu machos de 6 semanas, los cuales fueron divididos en grupos de 6 e inyectados con células HEK293 sobre-expresando (RAC3/círculos negros) o con niveles endógenos (EV/ cuadrados grises) de RAC3, tal como se describe en materiales y métodos. La formación de tumores fue monitoreada cada 3 días y una vez que se establecieron se midió el diámetro promedio de los 6 tumores desarrollados a partir del cual se calculó el volumen tumoral. Las marcas representan la media \pm SD del volumen tumoral en 6 ratones por condición (T-test).

De acuerdo con los resultados obtenidos, podría concluirse que los cambios generados únicamente por sobreexpresión de RAC3 resultarían insuficientes para la generación de cancer *in vivo*, pudiendo originarse solo tumores de carácter benigno y fácil remisión, o bien, que efectivamente ocurre una transformación maligna *in vitro*, pero la preservación de estas características *in vivo* requiere de un contexto de

señales adicionales quizás ausentes o débiles en animales nude, como por ejemplo, un microambiente inflamatorio.

Si bien ha sido reportado que la sobreexpresión de RAC3 induce la expresión de VEGF lo cual favorece la angiogénesis, no se debe descartar que la remisión del tumor sea consecuencia de una respuesta pro-angiogénica ineficiente que limite el crecimiento tumoral.

Parte III

4.9- Contribución del microambiente inflamatorio a los efectos inducidos por sobreexpresión de RAC3

TNF es una de las citoquinas de producción constitutiva en el microambiente tumoral característica de muchos tumores malignos cuya presencia además se asocia con un mal pronóstico (Chew et al, 2010; Michalaki et al, 2004). TNF facilita directamente el desarrollo tumoral mediante la regulación de la proliferación y supervivencia de las células neoplásicas o bien ejerce sus efectos indirectamente a través de células endoteliales y otras células inflamatorias del microambiente tumoral. Además, en células tumorales TNF es un fuerte inductor de la vía TNF/NF- κ B/SNAIL que está implicada en la inducción de TEM y aumento de la capacidad metastásica (Wu & Zhou, 2010)

Recientemente, hemos demostrado que TNF aumenta los niveles de expresión de RAC3 por un mecanismo dependiente de NF- κ B (Alvarado et al, 2014). De existir esta misma regulación en células tumorales, entonces, el microambiente inflamatorio podría potenciar la expresión o actividad de RAC3. De acuerdo con estas evidencias, se procedió a investigar el efecto de TNF sobre la acción biológica de sobreexpresión de RAC3 y de esta manera evaluar, cómo el microambiente inflamatorio podría contribuir a la tumorigénesis asociada a la sobreexpresión de RAC3.

4.9) A- La sobreexpresión de RAC3 es necesaria para que TNF induzca TEM

Con el objetivo de determinar el efecto de TNF sobre la expresión de marcadores de TEM, se efectuaron más experimentos en células HEK293. Como puede observarse en la siguiente figura, la estimulación con TNF por 24h, produjo un sutil aumento en los niveles de Vimentina y la inhibición de E-Cadherina en células control (EV) según se detectó por qPCR y este efecto fue significativamente potenciado por la sobreexpresión de RAC3 (Figura 55 A y B).

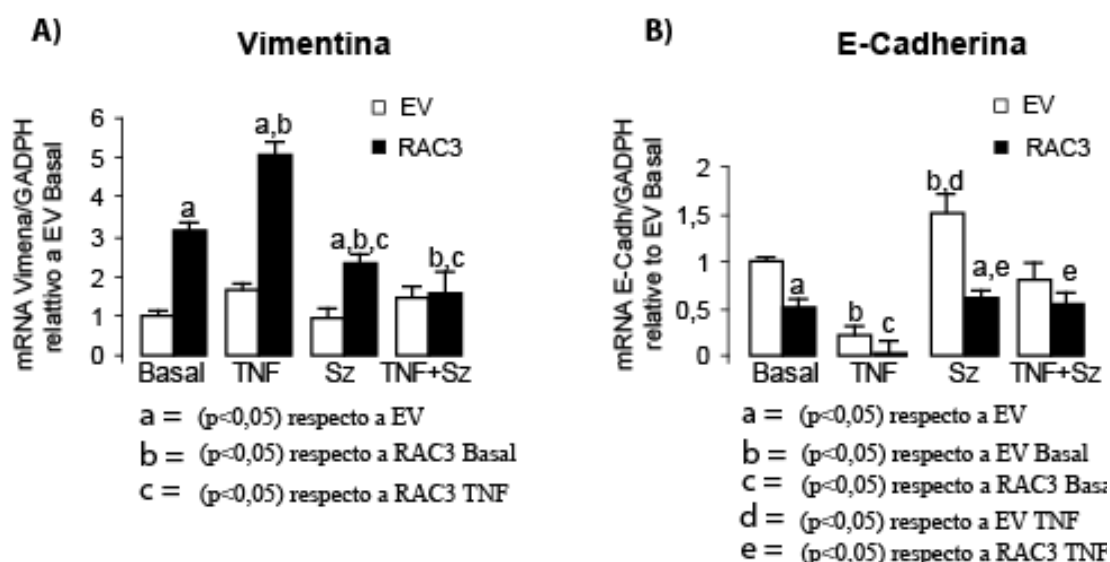


Figura 55: TNF potencia la TEM inducida por sobreexpresión de RAC3. Células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o con niveles endógenos de RAC3 (EV) fueron estimuladas por 24hs con TNF 20ng/ml, tal como se describe en materiales y métodos. Los niveles de Vimentina y E-Cadherina fueron analizados por qPCR utilizando primers específicos. Las barras representan la media \pm SD de tres experimentos independientes (ANOVA, Tukey)

Además, los efectos sobre la expresión de E-Cadherina correlacionaron con los cambios observados en los niveles de expresión de su represor de la transcripción SNAIL (Figura 56).

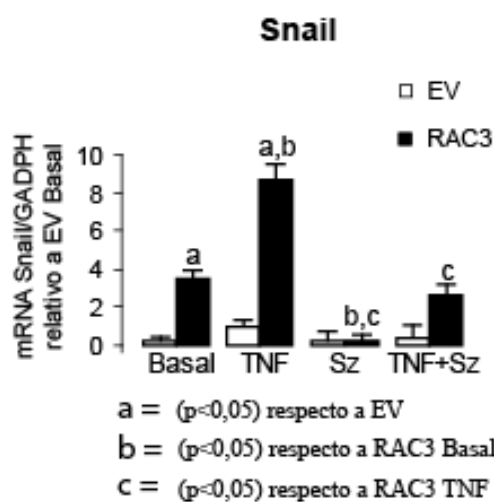


Figura 56: TNF potencia la expresión de Snail inducida por sobreexpresión de RAC3. Células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o con niveles endógenos de RAC3 (EV) fueron estimuladas por 24hs con TNF 20ng/ml, tal como se describe en materiales y métodos. Los niveles de Snail fueron analizados por qPCR utilizando primers específicos. Las barras representan la media \pm SD de tres experimentos independientes (ANOVA, Tukey)

Siendo Vimentina y SNAIL genes blanco de NF- κ B, los efectos observados por tratamiento con TNF en cuanto a sus niveles de expresión eran predecibles al igual que los efectos inhibitorios por pretratamiento con el inhibidor de la IKK, aún en ausencia de estímulo con TNF, que resulta en la inhibición de la activación de NF- κ B, aunque no podría descartarse la participación de esta actividad enzimática sobre otros blancos, más allá de NF- κ B, tal es el caso de RAC3, descrito como sustrato de la IKK (Wu et al, 2002)

Resultados similares fueron obtenidos por WB de Vimentina y E-Cadherina (Figura 57A y B) cuando RAC3 fue sobre-expresado.

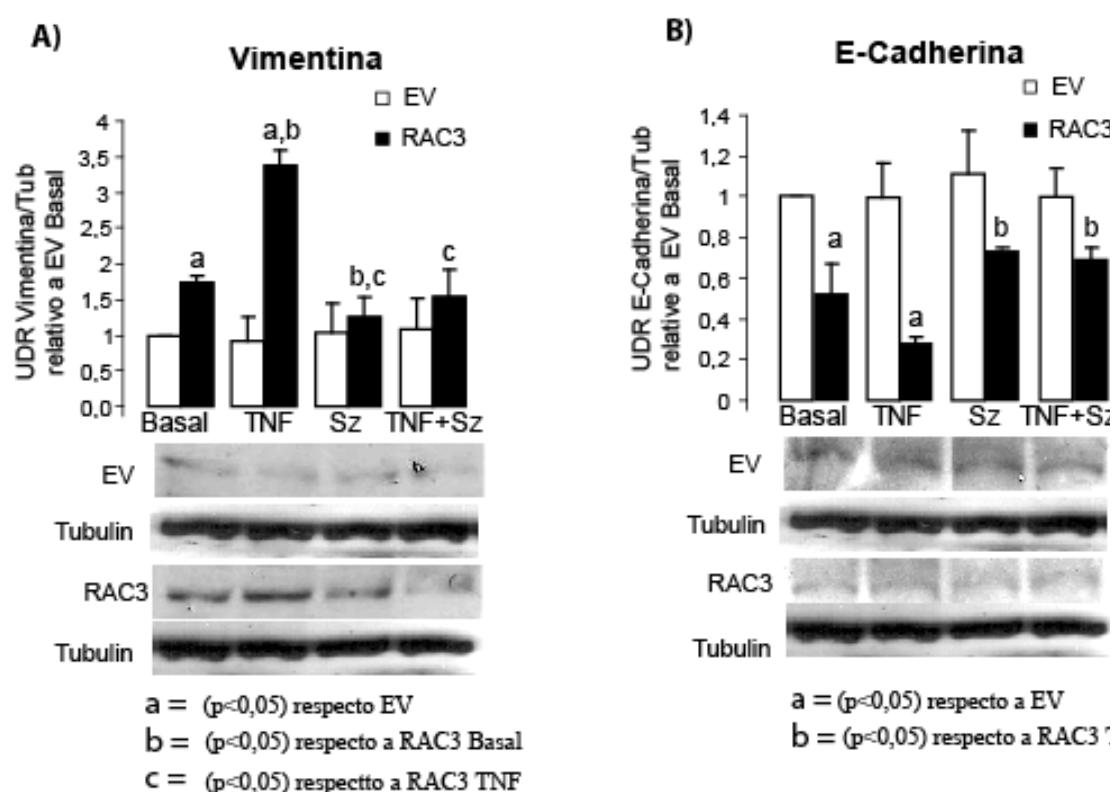


Figura 57: TNF potencia la TEM inducida por sobreexpresión de RAC3. Células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o con niveles endógenos de RAC3 (EV) fueron estimuladas por 24hs con TNF 20ng/ml, tal como se describe en materiales y métodos. Los niveles de Vimentina y E-Cadherina fueron analizados por WB utilizando primers específicos. Las barras representan la media \pm SD de tres experimentos independientes (ANOVA, Tukey)

Siendo IKK una de las rutas que pueden ser activadas por TNF, decidimos investigar su rol en los efectos observados. Sz es un inhibidor específico de IKK y esta quinasa es la encargada de fosforilar I κ B marcándolo para su degradación con la consecuente activación de NF- κ B. De acuerdo con los resultados aquí presentados, se demostró que el pretratamiento con Sz significativamente inhibió

no solo los efectos observados de TNF sobre las células que sobre-expresan RAC3 (Figura 56A, B y 57), sino también parte del efecto de sobreexpresión de RAC3. Dado que Vimentina y el inhibidor de E-Cadherina SNAIL son blancos de NF- κ B, estos resultados sugieren que la activación de NF- κ B puede estar involucrada en los efectos observados sobre la expresión de estas proteínas por sobreexpresión de RAC3 y TNF podría estar potenciando el rol transformante de RAC3 a través de esta vía.

Con anterioridad, en esta tesis, se demostró que la sobre-expresión de RAC3 induce cambios morfológicos compatibles con células en TEM.

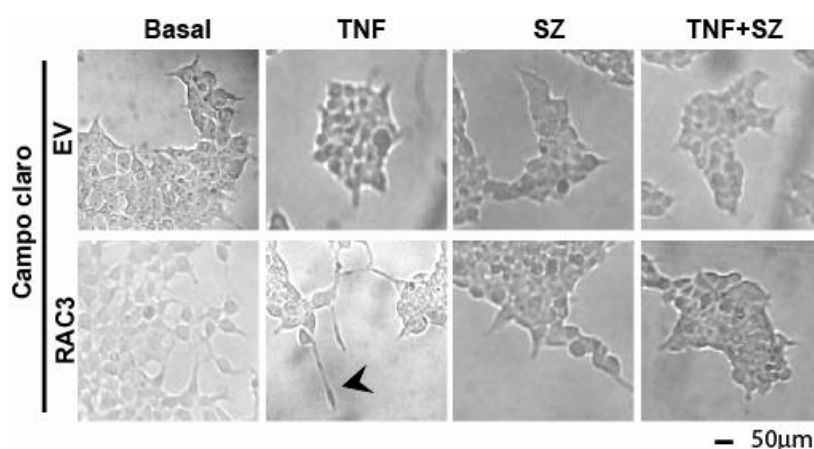


Figura 58: El TNF potencia los efectos observados por sobreexpresión de RAC3. Células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o con niveles endógenos de RAC3 (EV) fueron estimuladas por 24hs con TNF 20ng/ml, con o sin SZ (Sz) tal como se describe en materiales y métodos. Luego las células fueron fijadas. Las imágenes fueron tomadas en microscopio una magnitud en campo claro a una magnitud 40X.

Observamos que cuando RAC3 está sobre-expresado las células presentan una morfología ahusada, con mayor número de proyecciones citoplasmáticas y con baja interacción célula-célula. Como se puede observar, en la figura 58, TNF tiene un efecto potenciador sobre el número y longitud de las proyecciones citoplasmáticas.

Tal como se observa en las imágenes, cuando las células fueron pretratadas con Sz, (el inhibidor de la IKK necesario para la activación de NF- κ B) el número y longitud de proyecciones citoplasmáticas se reduce dramáticamente.

Además analizamos los niveles y localización de Vimentina, típico marcador de TEM en las líneas celulares tumorales, T47D y HeLa; quienes en condiciones normales sobre-expresan RAC3 (SC) y en las cuales silenciamos su expresión mediante la transfección de un shRNA-RAC3 (shRNA).

Como se observa en la figura 59, el tratamiento de la línea T47D (A) y HeLa (B) con TNF induce un marcado aumento en la expresión de Vimentina con respecto a la condición basal y que esta localiza principalmente en el lamelipodio. Sin embargo el estímulo con TNF cuando RAC3 se encuentra silenciado es incapaz de inducir la expresión de este marcador mesenquimático en ambas líneas celulares indicando que RAC3 es necesario para los efectos inducidos por el estímulo con TNF.

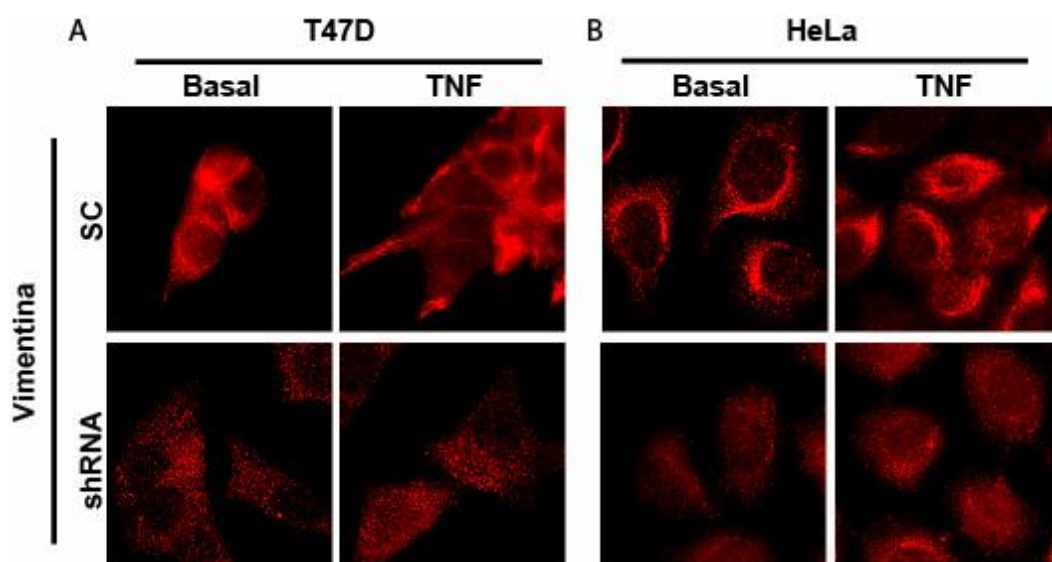


Figura 59: RAC3 es necesario para la expresión de Vimentina inducida por TNF. Células tumorales HeLa (panel superior) o T47D (panel inferior) sobre-expresando RAC3 (SC) o con su niveles silenciado (shRNA) fueron estimuladas por 24hs con TNF 20ng/ml, tal como se describe en materiales y métodos. Luego, las células fueron fijadas e incubadas con anti-Vimentina y anticuerpo secundario conjugado a Rodamina. Las imágenes fueron tomadas en microscopio de fluorescencia a una magnitud 100X.

Estos resultados permiten concluir que una expresión elevada de RAC3 genera un ambiente permisivo para la TEM inducida por el estímulo con TNF en las líneas células tumorales.

4.9) B- Efecto de TNF sobre la migración inducida por sobreexpresión de RAC3

La actividad migratoria e invasiva es una de las habilidades que las células deben adquirir para poder producir un foco metastásico. De acuerdo a lo observado en cuanto a la transformación inducida por sobreexpresión de RAC3 y la estimulación con TNF, se investigó la capacidad migratoria de células HEK293 con altos o normales niveles de expresión de RAC3 estimuladas o no con TNF.

Los resultados obtenidos demostraron que cuando los niveles de coactivador son los normales endógenos (células EV), las células son incapaces de migrar en cualquiera de las condiciones, sin embargo cuando RAC3 está sobre-expresado, el TNF es capaz de inducir un aumento significativo en la migración de células HEK293 (Figura 60) e interesantemente la inhibición de IKK con SZ bloqueó totalmente la migración.

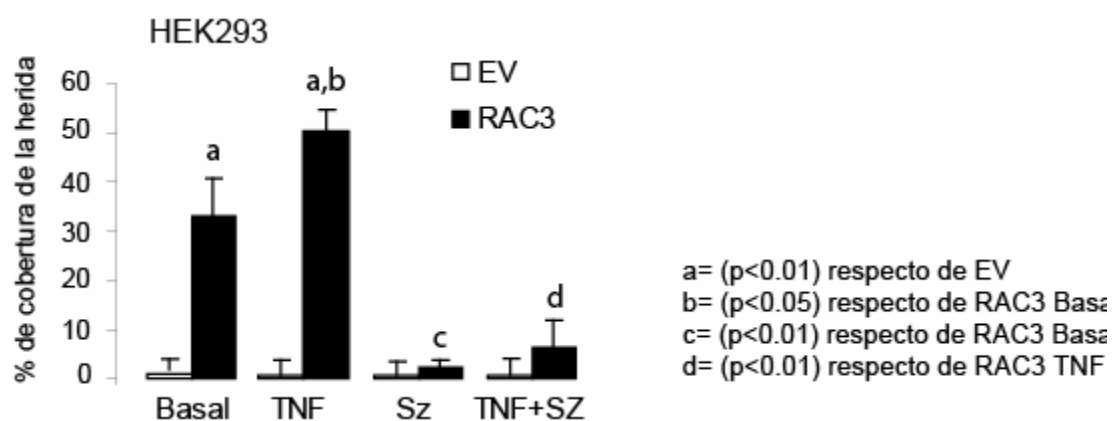


Figura 60: TNF potencia la migración inducida por sobreexpresión de RAC3. Células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o con niveles endógenos de RAC3 (EV) fueron estimuladas por 24hs con TNF 20ng/ml, tal como se describe en materiales y métodos. La migración fue evaluada mediante la técnica de cicatrización de la herida. Las barras representan la media \pm SD de tres experimentos independientes

Nuevamente, como en otros ensayos, el pretratamiento con SZ inhibió la migración celular, aún la inducida solo por sobreexpresión de RAC3, demostrando que la actividad IKK es necesaria para esta respuesta biológica.

Resultados similares que avalan el rol de RAC3, de la IKK y de TNF fueron obtenidos cuando se analizó la migración en células tumorales T47D y HeLa las cuales presentan niveles endógenos elevados de RAC3. Como se observa en la figura, en la condición control (SC), TNF fue capaz de inducir la migración de dichas células. Sin embargo, cuando RAC3 fue silenciado, TNF resultó incapaz de inducir la migración antes observada.

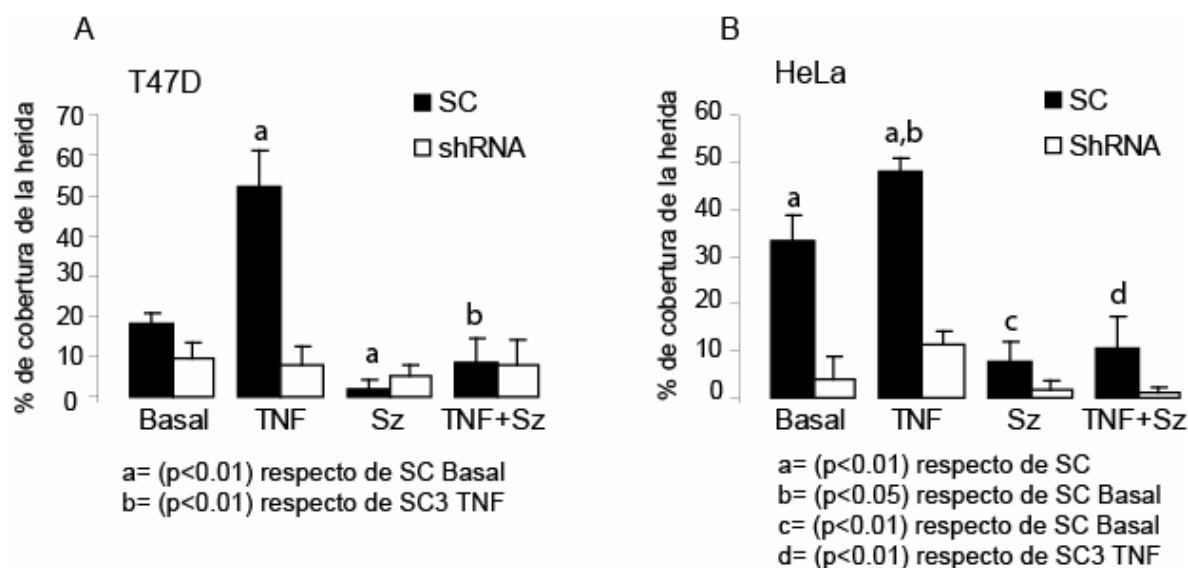


Figura 61: La sobreexpresión de RAC3 es necesaria para inducir migración. Células tumorales T47D (A) y HeLa (B) sobre-expresando RAC3 (SC) o con su niveles silenciado (shRNA) fueron estimuladas por 24hs con TNF 20ng/ml, tal como se describe en materiales y métodos. La migración fue evaluada mediante la técnica de cicatrización de la herida. Las barras representan la media \pm SD de tres experimentos independientes (ANOVA, Tukey).

El aumento de la capacidad migratoria de células T47D por tratamiento con TNF resultó muy interesante, dado que esta línea tiene una baja capacidad migratoria.

4.9) C-Efecto de TNF sobre la actividad MMP inducida por sobreexpresión de RAC3

Como correlato del aumento de la capacidad migratoria con la capacidad invasiva por tratamiento con TNF en el contexto de altos niveles de RAC3, se analizó la expresión y actividad de MMP2 y 9, enzimas encargadas de la degradación de la matriz extracelular e íntimamente relacionadas con el potencial invasivo de células tumorales. Como se observa en la figura, tanto la sobreexpresión de RAC3 como el tratamiento con TNF tienen la capacidad de aumentar los niveles de expresión de mRNA de MMP2 aunque la combinación de ambos estímulos: sobreexpresión de RAC3 en contexto inflamatorio indujeron niveles óptimos de MMP2 (Figura 62).

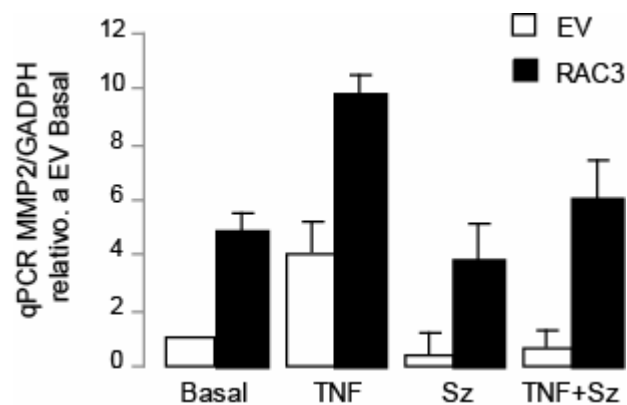


Figura 62: TNF induce la expresión de MMP2. Células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o con niveles endógenos de RAC3 (EV) fueron estimuladas por 24hs con TNF 20ng/ml, tal como se describe en materiales y métodos. Los niveles de MMP2 fueron analizados por qPCR utilizando primers específicos. Las barras representan la media \pm SD de tres experimentos independientes (ANOVA, Tukey)

Dado que un aumento en los niveles de expresión de enzimas proteolíticas no siempre se traduce en un aumento de su actividad, se analizó el efecto de TNF sobre la actividad MMP2 y 9.

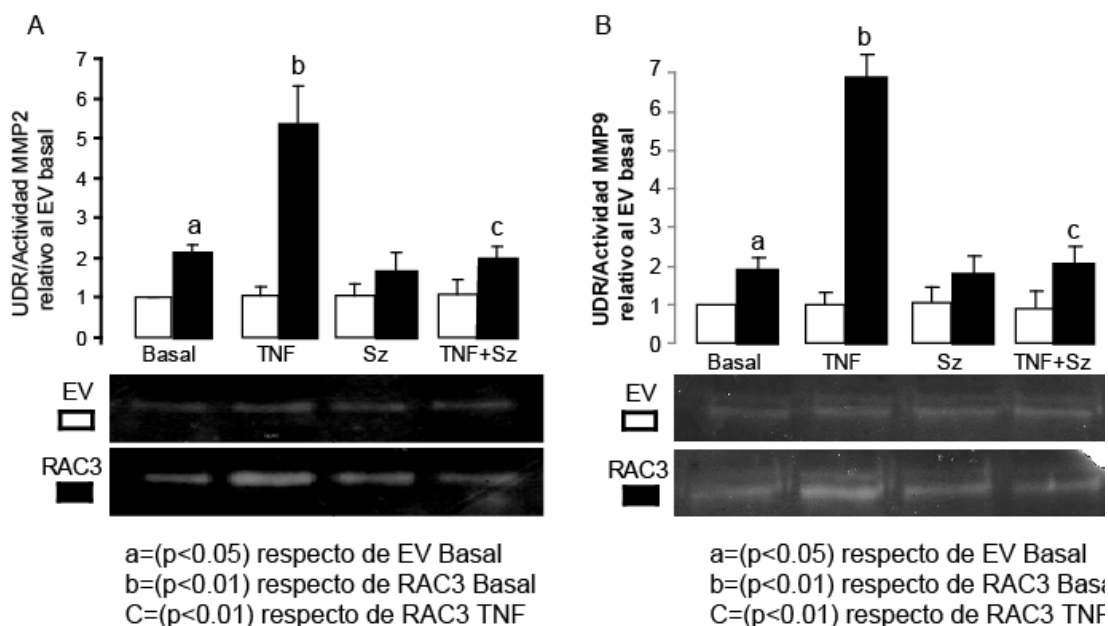


Figura 63: TNF induce la actividad de MMP2 y 9. Células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o con niveles endógenos de RAC3 (EV) fueron estimuladas por 24hs con TNF 20ng/ml, tal como se describe en materiales y métodos. La actividad MMP2 y fue analizada por zimografía en gel copolimerizado con gelatina. Las barras representan la media \pm SD de tres experimentos independientes (ANOVA, Tukey)

Como en el caso de la expresión de Vimentina, SNAIL y la respuesta migratoria, la expresión de metaloproteasas también requiere de la actividad IKK, dado que todos los efectos inductores fueron inhibidos por pretratamiento con SZ.

4.10- La sobreexpresión de RAC3 en un contexto inflamatorio favorece la actividad de NF- κ B y β -Catenina

E-Cadherina juega un rol dual en las células, además de su rol estructural en uniones adherentes célula-célula. E-Cadherina media la dinámica de β -Catenina, la cual actúa como un activador de la transcripción de la familia de factores de transcripción TCF/LEF. En el núcleo β -Catenina aumenta la actividad transcripcional de TCF aumentando la expresión de genes involucrados en oncogénesis, proliferación, diferenciación, TEM y mantenimiento de características de CMT, interesantemente su actividad biológica es muy similar a la NF- κ B. Ciertamente, la translocación a núcleo y transactivación de β -Catenina puede ser inducida por varios miembros de la familia Wnt. β -Catenina puede unirse a E-Cadherina por los mismos dominios de unión que a TCF/LEF. De este modo, cuando los niveles de E-Cadherina son altos, β -Catenina es reclutada en la membrana plasmática, inhibiendo su translocación a núcleo y con ello la activación de TCF. Existe una cantidad de β -Catenina citoplasmática formando un complejo con APC que regula su degradación.

Dado que la sobreexpresión de RAC3 causa una disminución en los niveles de expresión de E-Cadherina y que TNF potencia este efecto, se investigó cómo estas señales afectan la transactivación de β -Catenina y NF- κ B.

4.10) A- Efecto de TNF sobre los niveles β -Catenina cuando RAC3 esta sobre-expresado

En una primera serie de experimentos, se analizó si los niveles de β -Catenina total resultaban modificados cuando RAC3 era sobre-expresado y el efecto de TNF sobre los mismos.

Los resultados obtenidos demostraron que los niveles de β -Catenina se encontraban incrementados en células sobre-expresando RAC3 constitutivamente (Figura 64), aunque que los mismos no resultaban modificados bajo el estímulo con TNF.

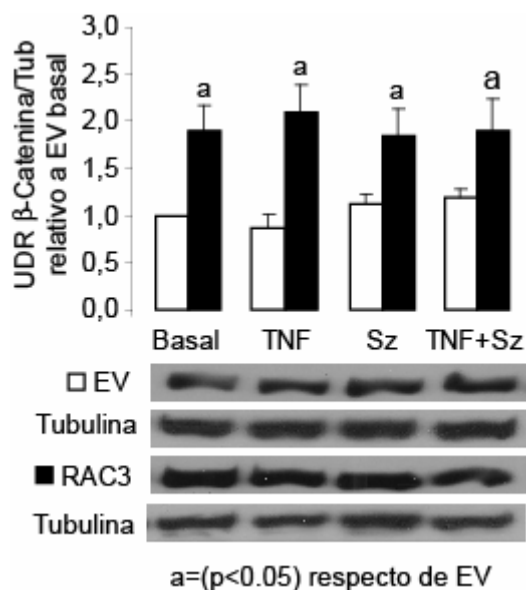


Figura 64: Expresión de β-Catenina. Células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o con niveles endógenos de RAC3 (EV) fueron estimuladas por 24hs con TNF 20ng/ml, tal como se describe en materiales y métodos. Los niveles proteicos de β-Catenina fueron analizados por WB. Las barras representan la media ± SD de tres experimentos independientes (ANOVA, Tukey)

4.10) B- La sobreexpresión de RAC3 induce la translocación de β-Catenina a núcleo bajo el estímulo con TNF

En otra serie de experimentos se investigó los posibles cambios en la localización subcelular de β-Catenina en condiciones de sobreexpresión de RAC3 y bajo estímulo o no con TNF.

Tal como se muestra en la figura 66, en condiciones control (EV), β-Catenina se encontró principalmente asociada a la membrana plasmática, mientras que cuando RAC3 estaba sobre-expresado (RAC3) se observó una deslocalización de β-Catenina a nivel de la membrana plasmática y muy poca translocación a núcleo.

Interesantemente, cuando se estimuló con TNF durante 24 hs y en condiciones de alta expresión de RAC3, β-Catenina mostró una localización predominantemente nuclear. Además, la translocación de β-Catenina bajo el estímulo con TNF resultó totalmente inhibida por pretratamiento con el inhibidor de IKK, SZ.

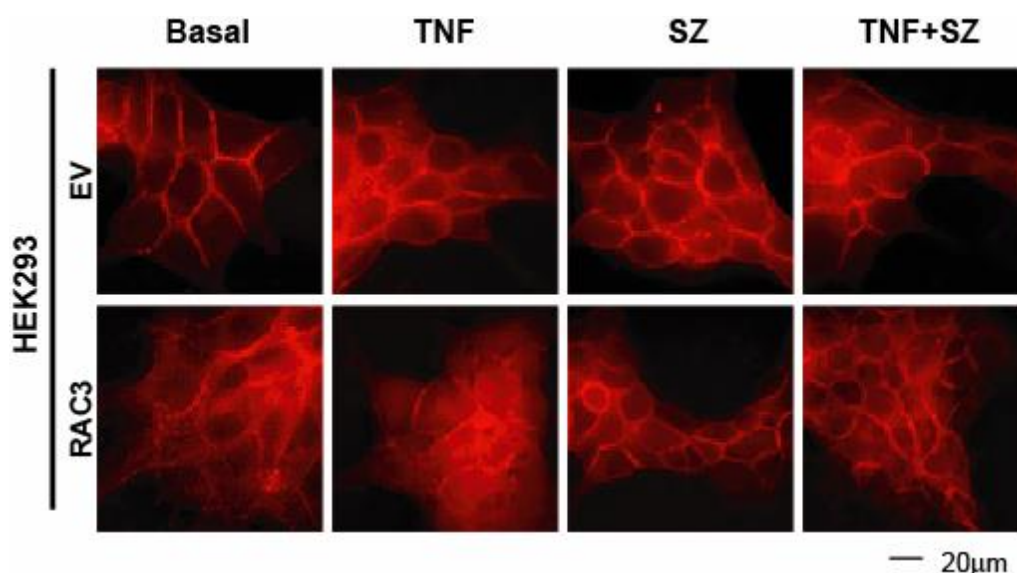


Figura 65: La sobreexpresión de RAC3 aumenta la translocación de β -Catenina a núcleo bajo el estímulo con TNF. Células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o con niveles endógenos de RAC3 (EV) fueron estimuladas por 24hs con TNF 20ng/ml, tal como se describe en materiales y métodos. Luego las células fueron fijadas e incubadas con anti- β -Catenina y anticuerpo secundario conjugado a Rodamina. Las imágenes fueron tomadas en microscopio de fluorescencia a una magnitud 100X.

Por lo tanto, los resultados hasta aquí obtenidos demuestran que la sola sobreexpresión de RAC3 contribuye al aumento en el contenido de β -Catenina y su deslocalización de membrana, pero, para una adecuada localización nuclear se requiere de señales adicionales, como por ejemplo la inducida por TNF y esta translocación involucra al menos la actividad IKK. Resultados similares fueron obtenidos en células tumorales T47D y HeLa que naturalmente sobre-expresan RAC3, en la cuales el tratamiento con TNF indujo un aumento de β -Catenina nuclear, luego de 24 hs de estímulo. Como en las células HEK293, los efectos de TNF resultaron completamente bloqueados por el pretratamiento con Sz.

Además, cuando la expresión de RAC3 fue silenciada (shRNA), en estas líneas, el estímulo con TNF no fue capaz de inducir la translocación de β -Catenina al núcleo, lo cual fue similar a lo observado en las células HEK293 con niveles normales endógenos bajos de RAC3 y estimuladas con TNF.

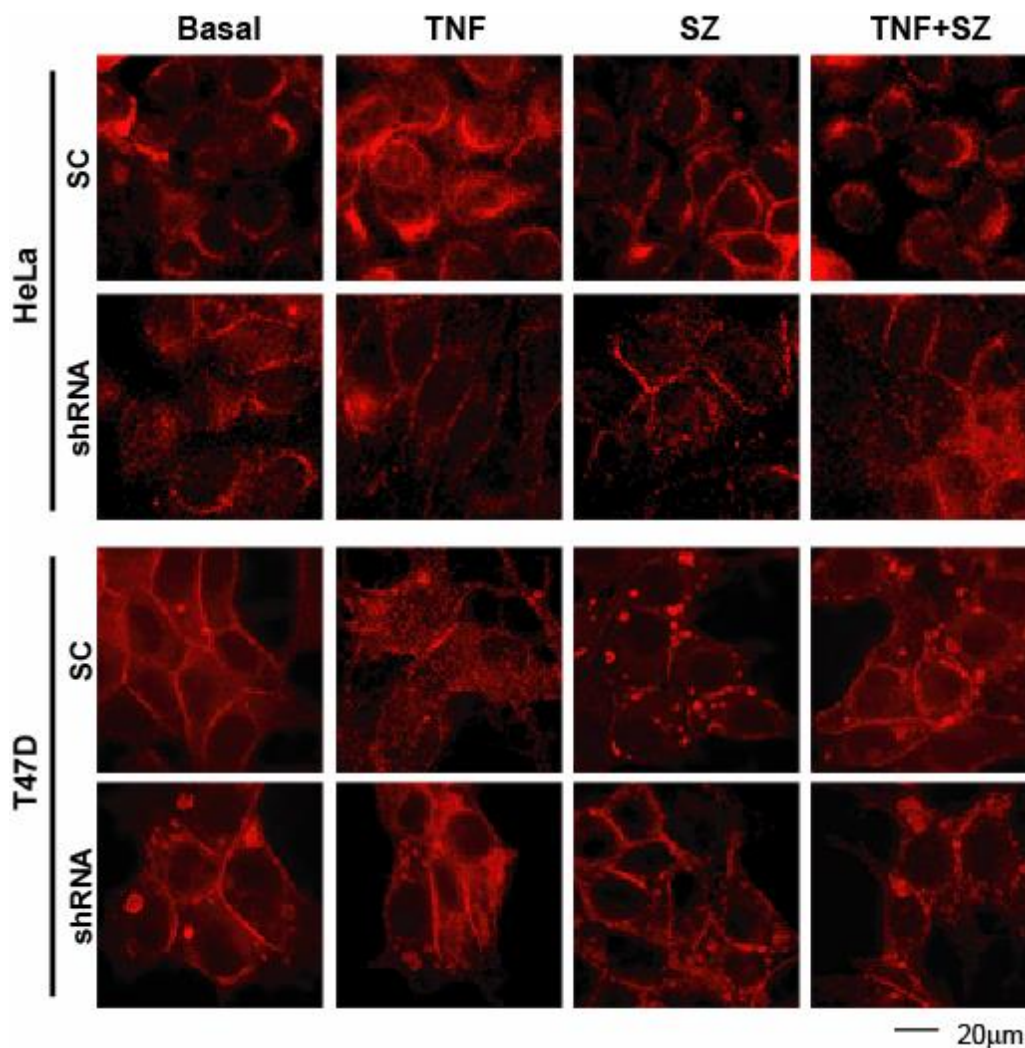


Figura 66: La sobreexpresión de RAC3 es necesaria translocación de β -Catenina a núcleo. Células tumorales HeLa (panel superior) o T47D (panel inferior) sobre-expresando RAC3 (SC) o con su niveles silenciado (shRNA) fueron estimuladas por 24hs con TNF 20ng/ml, tal como se describe en materiales y métodos. Luego, las células fueron fijadas e incubadas con anti- β -Catenina y anticuerpo secundario conjugado a Rodamina. Las imágenes fueron tomadas en microscopio de fluorescencia a una magnitud 100X.

Estos resultados, demuestran que la sobreexpresión de RAC3 es necesaria para que TNF pueda inducir la translocación de β -Catenina a núcleo. Más aún, la actividad IKK parecería ser un factor determinante para su translocación

4.10) C- Cinética de translocación de β -Catenina con el estímulo de TNF

En otra serie de experimentos se investigó la cinética de translocación nuclear de β -Catenina y NF- κ B luego de la estimulación con TNF. Los resultados obtenidos en este modelo experimental demostraron que NF- κ B puede ser detectado en el núcleo 1h luego de la estimulación con TNF tanto en células control (EV) como en células que sobre-expresan RAC3 (RAC3), lo cual se encuentra en concordancia con toda la bibliografía y experiencia previa del grupo (paper de Karin o cualquier review de NF- κ B, el oncogene de TNF y mama de Fer) y esa cinética no es afectada por sobreexpresión de RAC3 (Werbajh et al, 2000)

En el caso de β -Catenina, la máxima translocación nuclear se detectó a las 2 hs post estímulo con TNF y solo en células que sobre-expresan RAC3.

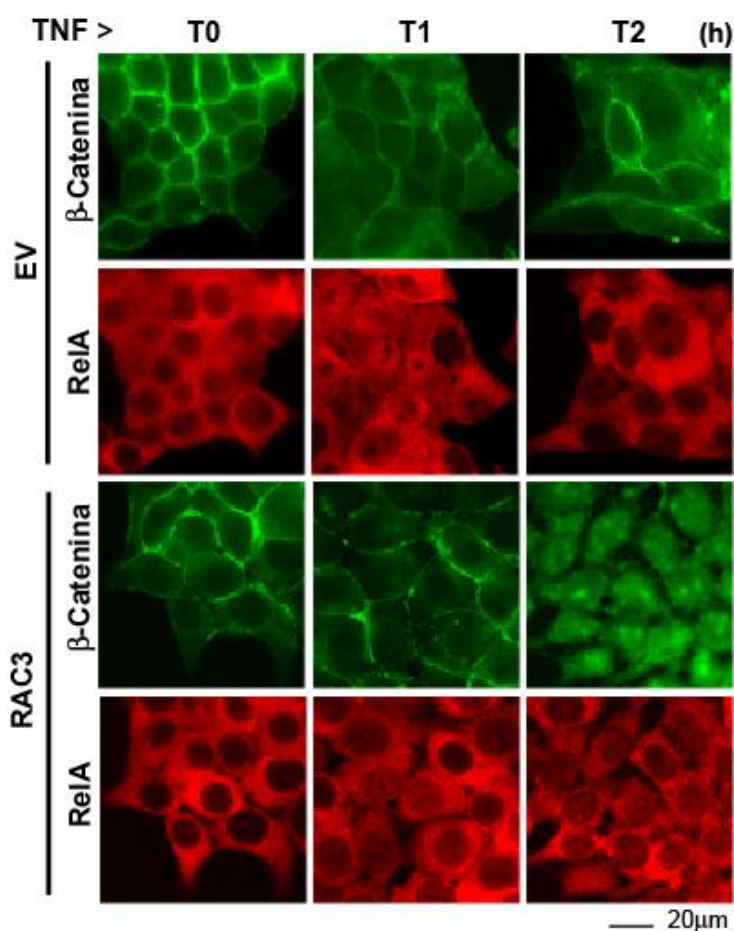


Figura 67: La sobreexpresión de RAC3 aumenta la translocación de β -Catenina a núcleo. Células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o con niveles endógenos de RAC3 (EV) fueron estimuladas por 24hs con TNF 20ng/ml, por 0, 1 o 2 hs. Luego las células fueron fijadas e incubadas con anti- β -Catenina (Verde) o RelA (Rojo). Las imágenes fueron tomadas en microscopio de fluorescencia a una magnitud 100X.

Resultados similares fueron obtenidos en células tumorales T47D con alto RAC3 endógeno (control). Sin embargo la translocación de β -Catenina se encontró inhibida cuando RAC3 fue silenciado (shRNA), en concordancia con lo observado en los experimentos descriptos previamente a las 24 hs (Figura 68).

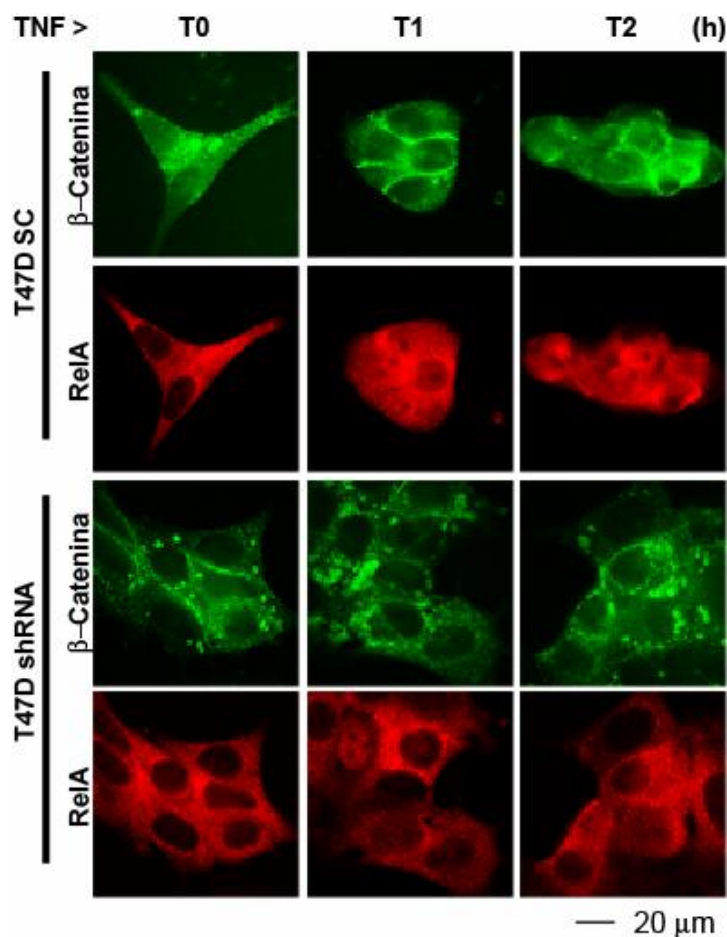


Figura 68: La sobreexpresión de RAC3 aumenta la translocación de β-Catenina a núcleo. Células tumorales o T47D sobre-expresando RAC3 (SC) o con su niveles silenciado (shRNA) fueron estimuladas por 24hs con TNF 20ng/ml, por 0, 1 o 2hs. Luego, las células fueron fijadas e incubadas con anti-β-Catenina (verde) o RelA (rojo). Las imágenes fueron tomadas en microscopio de fluorescencia a una magnitud 100X.

4.10) D- La sobre expresión de RAC3 aumenta la actividad transcripcional de β-Catenina

De acuerdo con los resultados obtenidos, a las dos horas post estímulo con una citoquina inflamatoria como TNF y en un contexto de alta expresión de RAC3, se puede inducir una translocación nuclear considerable de β-Catenina y el proceso es además dependiente de la actividad IKK. Este cambio en la localización subcelular podría correlacionar con un aumento en su actividad transcripcional. Para investigarlo, se realizaron ensayos reporteros específicos para la actividad de β-Catenina y de NF-κB.

Como era de esperar TNF fue capaz de incrementar la actividad transcripcional de NF-κB tanto en células sobre-expresando RAC3 como en las control (EV), siendo potenciado cuando RAC3, coactivador de NF-κB, estaba sobre-expresado (Figura 69A).

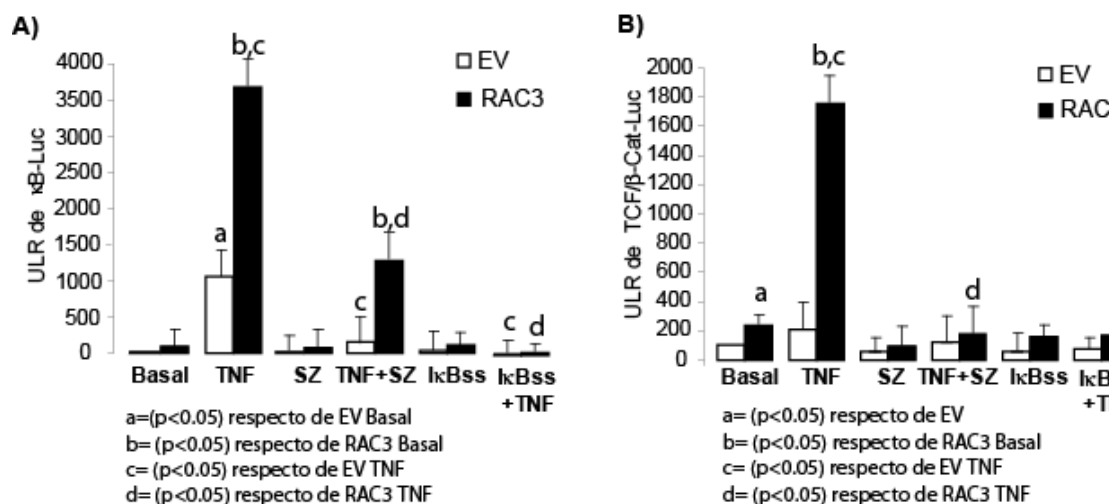


Figura 69: La sobreexpresión de RAC3 aumenta la actividad transcripcional de β -Catenina. Células HEK293 sobre-expresando (RAC3) o con niveles endógenos de RAC3 (EV) fueron transfectadas con los vectores reporteros de la actividad NF- κ B (κ B-Luc) o TCF/ β -Catenina (TOP-Luc TCF/ β -Cat) o en combinación con el vector de expresión constitutiva del represor de NF- κ B (I κ Bss), tras lo cual fueron estimulados con TNF 20 ng/ml, tal como se describe en materiales y métodos. Luego de 24 hs de estímulo las células fueron cosechadas y la actividad reportera fue analizada utilizando un luminómetro. Las barras representan la media de las unidades de luminiscencia relativa (ULR) \pm SD de 3 experimentos independientes (ANOVA, Tukey).

En cuanto a la actividad transcripcional de TCF/ β -Catenina, se incrementó significativamente sólo cuando RAC3 estaba sobre-expresado (Figura 69B), lo cual correlaciona con el aumento en la translocación nuclear en presencia de TNF.

Como se puede observar Sz inhibió significativamente la transactivación de ambos factores. Además el mismo efecto fue observado cuando las células fueron cotransfectadas con el vector de expresión constitutiva I κ Bss (I κ B superrepresor), observándose un bloqueo de la transactivación de β -Catenina. Estos resultados demuestran que más allá de la dependencia de la actividad IKK por fosforilación de cualquier otro substrato, la actividad transcripcional de β -Catenina requiere de la actividad NF- κ B.

Estos efectos en la actividad transcripcional de β -Catenina por inhibición de la actividad IKK y de activación de NF- κ B podrían ser consecuencia de la inhibición de la translocación de β -Catenina al núcleo, tal como se demostró en los experimentos de translocación expuestos previamente. Sin embargo, la posibilidad de requerimiento de complejos conteniendo NF- κ B y β -Catenina que regulen su actividad transcripcional no puede ser descartada.

Hasta aquí hemos demostrado que TNF potencia los efectos observados por sobreexpresión de RAC3 y en particular que cuando RAC3 se encuentra sobre-expresado se induce la activación de TCF/ β -Catenina.

Como se mencionó en la introducción, las vías NF- κ B y TCF/ β -Catenina están involucradas en el mantenimiento de características de células madre tumorales y en particular ambas vías están implicadas en la TEM.

Por lo tanto, se procedió a investigar el efecto de la señal inflamatoria de TNF en el contexto de alta expresión o no de RAC3 sobre la expresión de un marcador stem como CD44.

De acuerdo con los experimentos realizados en HEK293 sobre la expresión de CD44 y mostrados previamente en esta tesis, la sobreexpresión constitutiva de RAC3 inducía una alta expresión de CD44 (Figura 3) y de acuerdo con los experimentos de eflujo de fluorocromo dependientes de MDR, puede concluirse que RAC3 estaría induciendo un fenotipo CMT. Si bien TNF potencia las acciones transformantes de RAC3, no es factible esperar que la citoquina per se sea transformante o induzca CMT.

Como se observa en la figura, el estímulo con TNF es capaz de aumentar los niveles de CD44 en células HeLa, lo cual es completamente revertido por el pretratamiento con SZ. Sin embargo, nuevamente cuando los niveles de RAC3 son silenciados se disminuyen los niveles de CD44 en condiciones basales y el estímulo con TNF es incapaz de inducir la expresión de CD44.

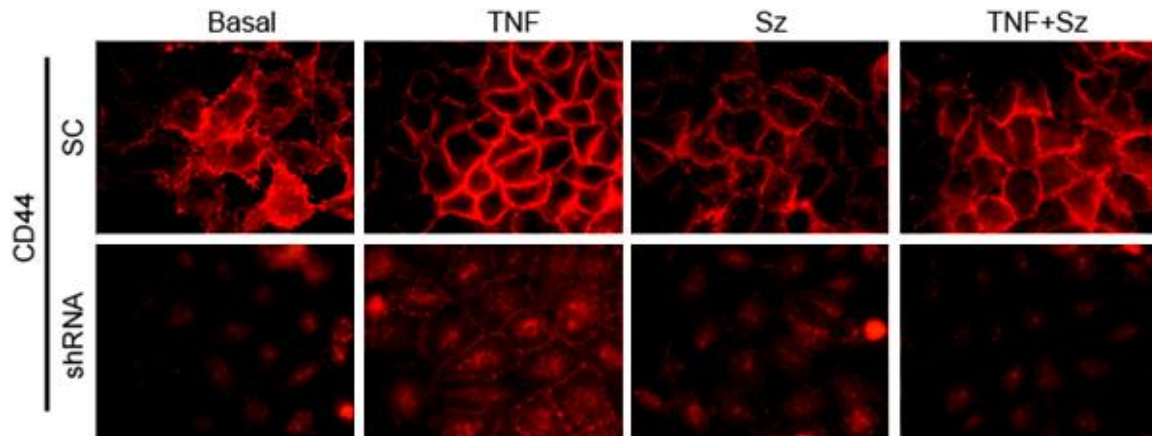


Figura 70: RAC3 es necesario para que TNF induzca la expresión de CD44. Células tumorales HeLa sobre-expresando RAC3 (SC) o con su niveles silenciado (shRNA) fueron estimuladas por 24hs con TNF 20ng/ml, como se describe en materiales y métodos. Luego, las células fueron fijadas e incubadas con anti-CD44 (rojo). Las imágenes fueron tomadas en microscopio de fluorescencia a una magnitud 100X.

Estos resultados nos permiten concluir que la sobreexpresión de RAC3 es necesaria para la TEM inducida por TNF y más aún, que su sobreexpresión es necesaria para el mantenimiento de características de célula madre tumoral como por ejemplo la expresión de CD44

5. DISCUSIÓN

Desde hace varias décadas se discute la existencia de CMT. Numerosas evidencias experimentales demostraron su existencia y todas sostienen el principio de que no todas las células de un tumor son capaces de regenerarlo cuando son implantadas en otro individuo, sino determinadas subpoblaciones que según el tipo tumoral, se identifican con marcadores específicos (Anwar and Kleer, 2013; Tysnes and Bjerkvig, 2007).

En términos generales, se pueden distinguir dos posibles patrones de proliferación celular dentro del tumor. En el modelo estocástico es la célula somática la que presenta una mutación y de ella, a través de un proceso de división no controlada se van acumulando nuevas alteraciones genéticas hasta alcanzar el estado de célula tumoral. Cada célula del tumor comparte inicialmente las mismas características y puede formar nuevos tumores primarios. En el modelo jerárquico o basado en la célula madre sólo una pequeña subpoblación del tumor, formado por CMT, es la encargada de iniciar el tumor. Estas CMT pueden explicar la heterogeneidad celular presente en los procesos neoplásicos a partir de la diferenciación celular de las células hijas. Según este modelo, las células hijas no son capaces de generar un nuevo tumor primario, ya que esta función es propia de las CMT. Para la génesis de la CMT existen dos posibilidades: una célula madre sana que sufre alguna alteración que la convierte en tumoral o una célula somática tumoral que por procesos de des-diferenciación, por mecanismo epigenómicos, adquiere propiedades de célula madre con comportamiento maligno.

RAC3 es una molécula que pertenece a la familia de coactivadores de receptores nucleares (Anzick et al., 1997; Torchia et al., 1998). Los coactivadores colaboran en el remodelado de la cromatina aumentando la actividad transcripcional de receptores nucleares y factores de transcripción y esto se debe a que estas moléculas poseen una actividad acetilasa de histonas (HAT), como es el caso de RAC3, o bien, reclutan a otras moléculas como CBP/p300 que aportan esa actividad, entre otras enzimas modificadoras de la cromatina (Liao et al., 2002; Torchia et al., 1998).

El caso de RAC3 despertó un interés particular, dado que varios trabajos demostraron que se encontraba sobreexpresado en tumores dependientes o respondedores a hormonas esteroideas como mama y próstata (Anzick et al., 1997; Gnanapragasam et al., 2001; Zhou et al., 2005), mientras que los tejidos normales tienen una expresión limitada o indetectable. Nuestro grupo demostró que RAC3, es un coactivador del factor de transcripción NF- κ B (Werbajh et al., 2000). Estos resultados hacían suponer que probablemente, de existir una sobreexpresión de este coactivador en otro tipo de tumores, podría estar jugando un rol clave al aumentar la

expresión de genes blanco de NF- κ B, que es un factor de transcripción inducido por múltiples señales además de citoquinas, involucrado en el control de diversas funciones biológicas, desde la respuesta inmune hasta su contribución a tumorigénesis aumentando la proliferación celular y control de ciclo celular, inhibición de apoptosis, expresión de moléculas de adhesión, entre otras (Costas et al., 1996; Ghosh and Karin, 2002; Guttridge et al., 1999; Hinz et al., 1999; Rubio et al., 2012). Así fue entonces que RAC3 comenzó a investigarse en otros tumores y se lo halló sobreexpresado en tumores de páncreas, hepático, gástrico y una lista creciente de otros (Henke et al., 2004; Sakakura et al., 2000; Wang et al., 2002; Yan et al., 2006), en lo que podría interpretarse como un factor común.

Una característica importante de esta molécula es que su rol oncogénico se debe exclusivamente a su sobreexpresión y no a mutaciones con ganancia de función. Aunque, los mecanismos responsables del descontrol observado en tumores aún no han sido del todo esclarecidos el hecho de que la sobreexpresión de RAC3 sea un factor común en distintos tipos de cáncer, nos lleva preguntarnos: ¿la sobreexpresión de RAC3 es causa o consecuencia del desarrollo tumoral?

Si bien actualmente se identifica a RAC3 como un oncogén, los trabajos que llevaron a esta caracterización fueron realizados en células tumorales o animales transgénicos, donde RAC3 ya se encuentra sobreexpresado y en todos los tejidos, o directamente está ausente. Incluso, cuando se utilizan células tumorales como modelo, la sobreexpresión de RAC3 no es la única diferencia respecto de células no tumorales, dado que las líneas celulares tumorales establecidas son portadoras de múltiples mutaciones. De este modo, a partir de estos modelos, poner a prueba la hipótesis de que la sobreexpresión de RAC3 es un evento temprano, o no, en la ontogenia tumoral, resulta muy difícil de determinar.

En otras palabras, el desarrollo tumoral más allá de su origen o no, involucra el acúmulo de numerosas mutaciones. En este sentido, para generar un tumor, la mutación o sobreexpresión de un oncogén no sería suficiente. Esta debería aportar, además, la posibilidad de que ocurran otras mutaciones, o bien aportar efectos que sumados a las otras mutaciones genere una ventaja adaptativa y los requisitos para la generación de un tumor. En relación a ello, habíamos demostrado previamente que la sobreexpresión de RAC3 en células no tumorales, inhibe procesos como la apoptosis y la autofagia (Fernandez Larrosa et al., 2012), procesos que cuando se encuentran inhibidos, pueden aumentar la inestabilidad genómica por daño al DNA y conducir de esta manera a la transformación tumoral (Yang and Klionsky, 2010).

En otros trabajos y más allá de su rol oncogénico, demostraron que RAC3 es un factor necesario para mantener el estado pluripotente y la autorrenovación de células madre (Percharde and Azuara, 2012; Percharde et al., 2012). Más aún, en otro trabajo publicado en este año, se demostró que RAC3 se encuentra en altos niveles en células madre embrionarias de ratón y su niveles bajan en el proceso de diferenciación. Por otro lado, la inhibición de la expresión del gen RAC3 por transfección de líneas de células madre de ratón con un siRNA para RAC3 inhibe la expresión de Nanog y otros genes relacionados con el mantenimiento del fenotipo de célula madre como Tbx3, Klf4, and Dax-1 (Chitilian et al., 2014). Estos hallazgos sumados al rol de RAC3 como oncogén nos llevó a pensar que quizá, la sobreexpresión de RAC3 podría estar contribuyendo a la tumorigénesis en etapas tempranas de la transformación tumoral, a través de la generación de células madre tumorales o al menos, la adquisición de algunas de sus propiedades, incluyendo inhibición de senescencia.

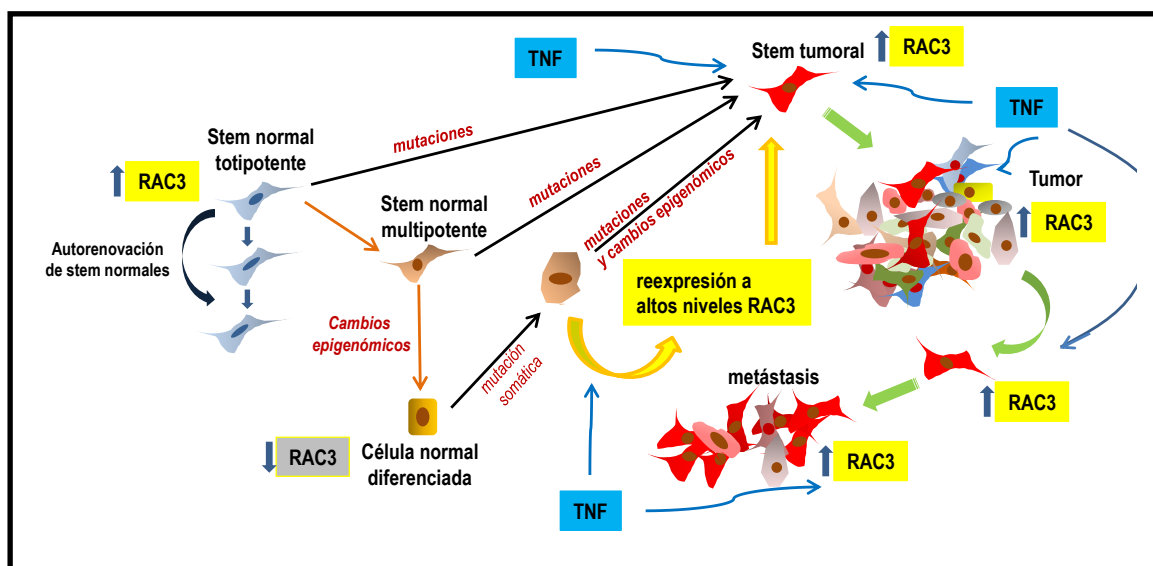


Figura 67: RAC3 en la génesis tumoral.

En esta tesis se utilizó como modelo, la línea celular HEK293 y el motivo de su elección se basó en que esta línea reúne una serie de características que la convierten en un buen modelo para responder las preguntas que llevaron a la elaboración de este trabajo. En primer lugar, esta línea celular deriva de células epiteliales embrionarias no tumorales, que si bien fueron transformadas con el adenovirus5, son incapaces de generar tumores cuando son inoculadas en ratones nude. A pesar de su origen embrionario, ha sido reportado que esta línea celular expresa marcadores epiteliales

como Citoqueratina18 y 8, además de mesenquimáticos como Vimentina (Levashova et al., 2003). Incluso, se ha demostrado que esta línea expresa E-Cadherina y su disminución se asocia a TEM en esta línea celular (Zhang et al.) lo cual indica que a pesar de su origen embrionario pueden experimentar una transición hacia un fenotipo menos diferenciado. Además, ha sido reportado que la expresión de miRNA302 induce la expresión de genes pluripotencia como OCT4, Sox2 y Nanog llevando a la línea HEK293 a un estado de pluripotencia que le permite diferenciar a células de las tres capas germinales (Koide et al.). Estos resultados indicarían que de producirse una transformación tumoral en esta línea celular, la misma podría experimentar todos los eventos necesarios para la generación de una neoplasia, con aumento en la proliferación e inhibición de mecanismos supresores tumorales, además de un aumento en la capacidad replicativa con inhibición de la senescencia celular, adquisición de capacidad metastásica y de diferenciarse en el tejido invasivo, siendo todas estas características asociadas principalmente a células madre tumorales.

Ha sido reportado que el crecimiento de células tumorales en condiciones de bajo contenido de suero aumenta la población CMT (Eyler and Rich, 2008; Tavaluc et al., 2007) lo que demuestra la independencia de factores de crecimiento para la proliferación de CMT. En el presente trabajo demostramos que la sobreexpresión de RAC3 induce la proliferación de células HEK293 aun en ausencia de factores de crecimiento. Más aún, ha sido reportado que el aumento en la capacidad proliferativa de células madre se debe a un acortamiento de la fase G1 (Coronado et al., 2012; Pauklin and Vallier, 2013), además pueden evadir el punto de restricción G1 a través de un mecanismo que involucra la sobreexpresión de Ciclina E (Coronado et al., 2012; Pauklin and Vallier, 2013). En el presente trabajo demostramos que la sobreexpresión de RAC3 causa un aumento en los niveles de Ciclina E en condiciones de escasos nutrientes, lo cual se encuentra en concordancia con lo antes expuesto indicando que posiblemente el aumento en la capacidad proliferativa se deba a la presencia de células con características de células madre tumorales.

Dentro de la heterogeneidad tumoral, en varios tipos de cancer, ha sido posible definir subpoblaciones de acuerdo a la presencia de marcadores específicos.

De acuerdo con estas evidencias, nuestro grupo demostró recientemente que la sobreexpresión de RAC3 en células no tumorales les otorga la capacidad de crecer formando colonias en soft agar (Rubio et al., 2012). Otro aspecto importante a destacar en este trabajo (Rubio et al., 2012) es el concepto de heterogeneidad o subpoblaciones dentro de un tumor. Si bien Ciclina D1 y RAC3 son moléculas altamente expresadas en tumores mamarios, nuestro trabajo demostró que cuando se

sobre-expresan juntas en la misma célula, sus efectos son mutuamente antagónicos, la proliferación se ve inhibida y se pierde la capacidad de crecer independientes de anclaje. De estas observaciones se desprende que, quizás, RAC3 no esté elevado homogéneamente en todas las células de un mismo tumor y podrían existir subpoblaciones llevando altos niveles de expresión. Más aún, esta sobreexpresión podría no ser constante, sino sometida a regulación por el ciclo celular (Rubio et al., 2012) y las condiciones del microentorno tumoral (Alvarado et al., 2014; Fernandez Larrosa et al., 2012). Estos resultados resultan relevantes en la biología de las células madre dado que ha sido previamente reportado que en el proceso de diferenciación de células madre, aumenta la expresión de Ciclina Ds (Pauklin and Vallier, 2013). Estos hallazgos sumados al hecho de que la sobreexpresión de RAC3 induce la expresión de Ciclina E y en relación al efecto antagónico de RAC3 con Ciclina D1, sugiere que la expresión de RAC3 en células tumorales efectivamente no sería homogénea y que su sobreexpresión estaría asociada a subpoblaciones con características de CMT.

De todo lo expuesto se desprende que si bien RAC3 es un oncogén, su efecto transformante cuando se sobre-expresa en células no tumorales podría deberse a la capacidad de generar células madre tumorales. En este sentido, resultaría interesante a futuro investigar los efectos de sobreexpresión de RAC3 por transducción viral en células humanas maduras diferenciadas no tumorales.

La identificación de la subpoblación CMT dentro de la heterogeneidad tumoral se realiza mediante la selección de las células tumorales que expresan marcadores de célula madre normal asumiendo que la CMT los sigue conservando. Así, en leucemias humanas por ejemplo, solo la población CD34⁺ CD38⁻, y no la CD34⁺CD38⁺ aislada por cell sorting de la muestra, es capaz de transferir la enfermedad a ratones si son trasplantadas (Soltysova et al., 2005). Algo similar ocurre con tumores de sistema nervioso en los cuales solo la población CD133⁺ es capaz de regenerar el tumor. En variado tipo de tumores, así como líneas celulares se distingue una “side population” con capacidad de autoperpetuarse y regenerar el tumor. En el presente trabajo demostramos que la sobreexpresión de RAC3 induce la expresión de CD44. Esta proteína de membrana funciona como molécula de unión célula-célula y célula matriz extracelular a través de la unión a ácido hialurónico, que es un componente importante de la matriz extracelular y principal componente del nicho *stem cell* (Basakran, 2015; Gee et al., 2004). La proteína CD44, se encuentra expresada en muchos tipos celulares, pero particularmente se la encuentra sobre-expresada en células hematopoyéticas, células madre y células tumorales con alta capacidad metastásica (Basakran, 2015). En relación a ello, es sabido que el gen de CD44 presenta una gran

variedad de isoformas por *splicing* alternativo (Basakran, 2015; Gee et al., 2004; Prochazka et al., 2014). La variante más común denominada CD44s o CD44 *estándar* de 85KDa aproximadamente se expresa en una gran variedad de tipos celulares (Gee et al., 2004; Prochazka et al., 2014). Sin embargo células tumorales expresan variantes por *splicing* que varían su peso molecular entre 110 y 250 KDa (Gee et al., 2004; Prochazka et al., 2014) y la expresión de estas variantes están asociadas al incremento en el potencial metastásico. En este trabajo de tesis se demostró que la sobreexpresión de RAC3 aumenta la expresión de la variante de 120KDa, también denominada CD44E , que es débilmente expresada en epitelios normales pero se encuentra sobre-expresada en algunos carcinomas (Gee et al., 2004). Si bien la expresión de CD44 puede ser regulada por múltiples vías, su regulación por el factor de transcripción NF- κ B y AP-1 en células de cáncer de mama triple negativo MDA MB231, ha sido asociada al aumento de su capacidad metastásica (Smith et al., 2014)

En la actualidad se han desarrollado varias técnicas *in vitro* para el estudio y aislamiento de células madre tumorales, que proporcionan métodos fiables para evaluar el potencial de una célula individual para regenerar el tumor. Un ejemplo lo constituye la capacidad de formar tumor-esferas en suspensión (Chen et al., 2014; Thoma et al., 2014). Los resultados del presente trabajo revelan que la sobreexpresión de RAC3 aumenta el potencial clonogénico, crecimiento de tumor-esferas en suspensión y aumenta la expresión de CD44, características compatibles con la adquisición de un fenotipo de célula madre tumoral. Más aun, nuestro análisis bioinformático a partir de bases de datos de microarrays revelan que la side population CD133+ de células tumorales, presentan una sobreexpresión de RAC3 con respecto a sus contraparte parental, indicando, que los resultados hallados no se restringen a la línea celular HEK293 y que efectivamente la sobreexpresión de RAC3 correlaciona con la expresión de marcadores *stem cell*.

Las CMT además de mostrar independencia en la proliferación y resistencia a la muerte celular, frecuentemente exhiben un aumento en el potencial replicativo y muestran una inhibición de la entrada en senescencia (Henan y Wiener 2000).

En términos generales la senescencia es un proceso asociado al envejecimiento (Martin et al., 2014; Piano and Titorenko, 2015) y es una estrategia biológica que las células utilizan para sobrevivir impidiendo la expansión clonal de células llevando DNA dañado (Collado et al., 2007) . Más aun, la senescencia, similarmente a la apoptosis o autofagia, pueden ser considerados mecanismos supresores tumorales (Campisi, 2005; Collado et al., 2007; Collado and Serrano, 2005).

En relación, con nuestros trabajos previos demostramos el rol inhibitorio de RAC3 sobre la apoptosis y la autofagia (Colo et al., 2007; Fernandez Larrosa et al., 2012), La pérdida de expresión de RAC3 está asociada a la diferenciación de células madre hacia un fenotipo maduro (Chitilian et al., 2014) donde además, es sabido que la actividad telomerasa es silenciada. De este modo, una sobreexpresión de RAC3 en combinación con telomerasa activa, sería una condición encontrada sólo en células madre y tumores, pero no en tejidos maduros normales, sugiriendo una posible relación entre ambas moléculas asociada a la inhibición de la senescencia. En el presente trabajo demostramos que la sobreexpresión de RAC3 en células HEK293 inhibe la senescencia prematura inducida por estrés genotóxico o metabólico. Si bien nosotros no observamos un aumento en los niveles totales de la proteína p53, si fue evidente, en las células control, el aumento de la misma en la fracción nuclear con respecto a la fracción citoplasmática, luego del estímulo con H₂O₂ o Rapamicina. Sin embargo, en células que sobre expresan RAC3 la localización de p53 fue predominantemente citoplasmática y el mismo efecto fue observado en cuanto a la localización de p21 y p16. Nuestros resultados indicarían que el mecanismo por el cual la sobreexpresión de RAC3 inhibe la senescencia prematura involucraría la inhibición de la activación de la vía p53-p21pRB y de la vía p16-pRB.

El 80% de los cánceres presentan una reactivación de los mecanismos involucrados en el mantenimiento de la longitud de los telómeros, lo que posibilita la adquisición de un potencial de replicación ilimitado en células tumorales. Más aún, esta capacidad de replicación ilimitada ha sido asociada a la subpoblación de CMT (Shay and Wright, 2010). En el presente trabajo demostramos que la sobreexpresión de RAC3 es necesaria para mantener la actividad telomerasa en células tumorales HeLa. Como es sabido, la línea celular HeLa deriva de células de cáncer de cuello uterino infectadas con el virus de Herpes Papiloma Virus (HPV). Es conocido que esta línea celular es positiva para telomerasa (Caan et al., 2006) ya que HPV inactiva p53 conduciendo a su activación. Sin embargo, existen evidencias de que el estado de p53 no estaría directamente relacionado con la actividad de telomerasa (Horner et al., 2004) y que su activación puede ocurrir, aun en ausencia de p53 (Milas et al., 1998) . Por otro lado existen evidencias de que la expresión de la subunidad catalítica de telomerasa hTERT es regulada por p21 (Bashash et al., 2012; Shats et al., 2004). En relación a ello, en el presente trabajo demostramos que la sobreexpresión de RAC3 correlaciona con una regulación negativa de p21, sugiriendo que la inhibición en la expresión de p21 por la sobreexpresión de RAC3 podría ser el mecanismo por el cual se activa la actividad telomerasa independientemente de p53. Además, ha sido

demostrado que hTERT es blanco directo del factor de transcripción NF- κ B (Wu and Lozano, 1994; Yin et al., 2000) el cual requiere de la expresión de RAC3 para su correcta actividad (Werbajh et al., 2000). En este contexto, es probable que la disminución de la actividad hTERT cuando RAC3 se encuentra silenciado, se deba a una disminución en la actividad de NF- κ B. Estos resultados tienen relevancia por el hecho de que la mayoría de las drogas quimioterapéuticas utilizadas hasta el momento intentan reducir el tumor ya sea provocando apoptosis o induciendo senescencia en las células tumorales (Ansieau and Collin, 2015). Sin embargo, es sabido que muchos tratamientos frente al cáncer no generan una respuesta de eliminación total de las células malignas y, por lo tanto, no conllevan su curación. En muchas ocasiones, un pequeño grupo de células resiste el ataque de los tratamientos de quimioterapia y radioterapia y logra escapar (Gordon and Nelson, 2012; Telleria, 2013). Estas células residuales se comportan como células activas tumorales con características similares a las células madre adultas del tejido correspondiente (Liao et al., 2014). Por estos motivos se considera que las CMT son más resistentes a la quimioterapia, y que los tratamientos actualmente utilizados podrían no afectarlas (Holohan et al., 2013; Moitra, 2015). También se ha publicado que las células madre poseen genes de resistencia a fármacos, como la proteína de resistencia del cáncer de mama (BCRP ABCG2) (Holohan et al., 2013; Moitra, 2015). En el presente trabajo demostramos que la sobreexpresión de RAC3 en células no tumorales HEK293 aumenta la expulsión de Hoechst, lo cual, se encuentra estrictamente relacionado a la expresión y actividad de bombas de expulsión de fármacos y es un método para la determinación de contenido stem en una población celular. De hecho, nuestro análisis de bancos de datos públicos de microarrays, revelan que la línea celular de mama MDA MB231 y células leucémicas resistentes a Paclitaxel y Ciclofosfamida respectivamente, así como células de cáncer de ovario resistentes a Metrotexato, muestran una sobreexpresión de RAC3 con respecto a su contraparte sensible a la droga. Es interesante notar que esta sobreexpresión de RAC3, correlaciona con la expresión de la proteína de resistencia a multidrogas ABCG2, indicando que los resultados hallados en el presente trabajo no se restringen a los efectos de sobreexpresión de RAC3 en la línea celular HEK293, y que efectivamente la sobreexpresión de RAC3 contribuiría o bien correlaciona con la resistencia a tratamientos quimioterapéuticos, no solo como factor anti-apoptótico sino también por una exclusión de esas drogas a través de MDR. Estos resultados, sumados al hecho de que la sobreexpresión de RAC3 inhibe la senescencia prematura, indicarían que la modulación farmacológica de RAC3, podría

contribuir a mejorar la eficiencia de los tratamientos quimioterapéuticos actuales, aumentando la efectividad de dichas drogas.

La estructura tridimensional nativa de los carcinomas gobierna numerosas interacciones autócrinas y parácrinas relacionadas a la progresión del tumor. El microambiente tumoral se caracteriza por una matriz extracelular rígida debido a la sobreexpresión de proteínas de matriz extracelular por células del estroma y por las propias células tumorales.

En los últimos años se ha avanzado en el uso de agregados celulares tridimensionales o esferoides para el estudio in vitro de la biología tumoral. Muchos estudios revelan que las células cancerosas poseen capacidades variables en la formación de esferoides compactos y se ha sugerido que dicha capacidad tiene una correlación positiva con el potencial tumorigénico de dichas células. En el presente trabajo demostramos que la sola sobreexpresión de RAC3 en células no tumorales HEK293, confiere la capacidad de formar esferoides compactos a corto plazo. Como mencionamos anteriormente esta capacidad está asociada al potencial tumorigénico.

Muchos estudios han descrito el rol de Cadherinas e integrinas en el proceso de formación de esferoides (Lin et al., 2006; Robinson et al., 2003; Shimazui et al., 2004). Por ejemplo, se ha demostrado que E-Cadherina es la proteína responsable de la formación inicial de esferoides en líneas celulares como MCF7, T47D, BT474 y MDA-MB 361, mientras que las Integrinas B1 y B3 son las responsables de la formación de esferoides en las líneas celulares MDA-MB 231 y SKBR3 (Ivascu and Kubbies, 2007). Se ha demostrado que las líneas celulares que requieren de E-Cadherina para la formación de esferoides son poco tumorigénicas y poseen baja capacidad metastásica, por el contrario las líneas celulares que requieren de integrinas para la formación inicial de esferoides tienen una alta capacidad metastásica (Allen et al., 2011; Holliday and Speirs, 2011)

En el presente trabajo demostramos que la formación inicial de esferoides es independiente de E-Cadherina. Además, demostramos que la sobreexpresión de RAC3 favorece la adhesión celular a la matriz y promueve la agregación independiente de Cadherinas. De este modo, es altamente probable que la sobreexpresión de RAC3 promueva además la expresión de proteínas de matriz extracelular lo cual estaría permitiendo la formación de esferoides compactos.

Ha sido bien establecido que los cambios en la adhesión entre célula-célula y célula matriz extracelular, acompañan la transición hacia tumores invasivos y la subsecuente diseminación metastásica de células tumorales (Hanahan and Weinberg, 2011; Jackson et al., 2012). Incluso ha sido demostrado que la unión de moléculas de

adhesión a sus ligandos disparan cascadas de transducción de señal que acompañan el proceso invasivo y la autorenovación de células madre tumorales (Oskarsson et al., 2014). Todas estas observaciones demuestran que las moléculas de adhesión no solo juegan un importante rol en mediar la adhesión, sino que son críticas en modular cascadas de señalización intracelular (Bourguignon et al., 2009a). Por ejemplo, NF- κ B puede ser activado por la unión de CD44 a ácido hialurónico (Bourguignon et al., 2009b) o por unión de integrinas a Fibronectina (Klein et al., 2002; Qwarnstrom et al., 1994), componentes clave en el mantenimiento del nicho stem cell. En este trabajo demostramos que la formación de agregados multicelulares, cuando RAC3 se encuentra sobreexpresado, aumenta la activación de NF- κ B comparado con las células crecidas en monocapa. Esos resultados estarían demostrando que las interacciones célula-célula o célula matriz extracelular inducidas por sobreexpresión de RAC3 disparan señales que aumentan la actividad de este factor de transcripción tan asociado a tumorigénesis y al mantenimiento y autorrenovación de stem cell.

El concepto de célula madre tumoral ha tenido principal implicancia en el proceso metastásico (Brabletz et al., 2005; Li et al., 2007b). En términos generales las CMT tienen un potencial migratorio e invasivo más elevado y frecuentemente la adquisición de características mesenquimales, se asocia a la adquisición de características de células madre tumorales (Monteiro and Fodde, 2010; Rosen and Jordan, 2009). En términos generales, las células tumorales para poder invadir el tejido circundante, deben poseer o adquirir propiedades mesenquimales que se caracterizan por una baja expresión de moléculas de adhesión célula-célula, como E-Cadherina y una elevada expresión de Vimentina. Cuando esto ocurre en células epiteliales, este proceso es popularmente conocido como TEM. Sin embargo, este proceso no se restringe a células epiteliales ya que ha sido reportado en células madre y células no epiteliales como fibroblastos. En este trabajo demostramos que la sola sobreexpresión de RAC3 en células HEK293 induce un fenotipo menos diferenciado, compatible con células altamente mesenquimática y con una morfología totalmente polarizada. Además, demostramos que la sobre-expresión de RAC3 en células HEK293 aumenta la capacidad migratoria e invasiva mientras que su silenciamiento en células tumorales reduce ambas capacidades. De este modo, demostramos que efectivamente la sola sobre-expresión de RAC3 induce transformación tumoral con la adquisición de un fenotipo mesenquimático con aumento de la actividad migratoria e invasiva característico de células madre tumorales.

Con respecto a RAC3 en la generación de tumores por xenotrasplante, existen muchas evidencias que lo definen como oncogén (Kuang et al., 2004; List et al., 2001;

Zhou et al., 2005). Sin embargo, en todos estos trabajos se parte de células originalmente tumorales con sobreexpresión de RAC3. Este es el primer trabajo donde se evaluó el rol de RAC3 sobre la capacidad de desarrollo de tumores por xenotrasplante de células originalmente no tumorales, demostrándose que la sobreexpresión de RAC3 indujo la formación de tumores en los 6 ratones inyectados con células sobre-expresando RAC3 comparados con los ratones inyectados con células control a los 8 días post inyección. Sin embargo dichos tumores no pudieron establecerse en el tiempo y remitieron por completo al día 30 post inyección. De acuerdo con los resultados obtenidos, podría concluirse que los cambios generados únicamente por sobreexpresión de RAC3 resultarían insuficientes para la generación de cancer *in vivo*, pudiendo originarse solo tumores de carácter benigno y fácil remisión, o bien, que efectivamente ocurre una transformación maligna *in vitro*, pero la preservación de estas características *in vivo* requiere de un contexto de señales adicionales quizás ausentes o débiles en animales nude, como por ejemplo, un microambiente inflamatorio. Sin embargo, no se debe descartar que la remisión del tumor sea consecuencia de una respuesta pro-angiogénica ineficiente que limite el crecimiento tumoral.

No obstante, la limitación en la evolución de los tumores *in vivo* no invalida o contradice la presencia de CMT en la población de HEK293 sobre-expresando RAC3, pues, se sabe que la presencia de CMT *in vivo*, no necesariamente implica su inmediata generación de tumor, sino que pueden entrar en un periodo de latencia denominado *dormancy* en las cuales las células se encuentran en un estado de quiescencia (Oskarsson et al., 2014; Sosa et al., 2014). Por ejemplo, ha sido previamente reportado, que células de cáncer de ovario SKOV3 resistentes a cisplatino, que muestran características de CMT entran en estado de dormancy cuando son inoculadas en ratones *nude* (Zhou et al., 2014)

Muchos estudios revelan que la respuesta inflamatoria del microambiente tumoral juega un rol muy importante en el desarrollo de tumores. De hecho, se ha observado que en modelos animales donde se suprime la respuesta inflamatoria se produce una reducción en el volumen tumoral (Zhang et al., 2010). En relación a ello, los ratones atímicos son incapaces de generar una respuesta inflamatoria apropiada, de hecho, la histopatología de ratones Nu/Nu en comparación con ratones Nu/+ infectados con *Criptococcus neoformans* desarrollan una respuesta inflamatoria retrasada, menos intensa y con bajo contenido de macrófagos en la zona lesionada (Salkowski and Balish, 1991). De lo anterior, se desprende entonces que si bien la sobreexpresión de RAC3 induce transformación tumoral en las células HEK293 en

modelos *in vitro*, esta transformación no es suficiente para generar un tumor *in vivo*, o bien, que son necesarios estímulos adicionales que potencien el efecto transformante de RAC3, como por ejemplo la respuesta inflamatoria.

La asociación entre inflamación y el desarrollo de cáncer ha sido bien establecida (Mantovani et al., 2008). Existen evidencias que involucran a TNF como un mediador clave en la inflamación y el cancer (Hanahan and Weinberg, 2011). La producción constitutiva de TNF en el microambiente tumoral es característico de tumores malignos y su producción está asociado a un mal pronóstico (Wu et al., 2010).

En cuanto al rol de RAC3 como oncogén, hemos demostrado en esta tesis que su sola sobreexpresión induce una transformación que involucra la adquisición de un fenotipo de célula madre tumoral con aumento de la capacidad migratoria e invasiva, propio de células madre tumorales. Si bien los mecanismos por los cuales se produce la sobreexpresión de RAC3 en células tumorales no han sido del todo esclarecidos, en el año 2014 demostramos que los niveles de RAC3 son regulados por la respuesta inflamatoria a través de un mecanismo que involucra la activación de NF- κ B (Alvarado et al, 2014). Estos hallazgos pueden hacernos pensar, que si esta misma regulación pudiera ocurrir en las células tumorales, entonces, la respuesta inflamatoria local en el entorno tumoral podría jugar un rol clave, aumentando los niveles de expresión y probablemente cooperando en procesos de regulación de la expresión de moléculas involucradas en la transformación tumoral. Más aun, ha sido demostrado que citoquinas inflamatorias como TNF inducen la fosforilación de RAC3 con un aumento en la translocación a núcleo y de su actividad, en células tumorales (Wu et al., 2002).

En términos generales, TNF induce por ejemplo, TEM a través de la activación de NF- κ B, quien una vez activo transloca al núcleo y activa la expresión de sus genes blanco como Vimentina y represores de la expresión de E-Cadherina como SNAIL (Qin et al., 2008; Zhang et al., 2012b). NF- κ B puede inducir la expresión de SNAIL a través de unión directa con su promotor (Julien et al., 2007). Además, la vía TNF/NF- κ B estabiliza SNAIL por un mecanismo que involucra la expresión de CSN2 el cuál inhibe la fosforilación y ubiquitinación de SNAIL a través de la disrupción de la unión a GSK3 y β -Trcp (Wu and Zhou, 2010). SNAIL es fundamental en la TEM y metástasis de células tumorales ya que suprime la expresión de E-Cadherina por unión directa a su promotor (Wu and Zhou, 2010). De hecho, la expresión de SNAIL se ha detectado en células epiteliales y endoteliales de cáncer de mama mientras que es indetectable en células normales (Martin et al., 2005; Parker et al., 2004) y su expresión ha sido asociada con metástasis, recidivas y mal pronóstico (Peinado et al., 2007). En el presente trabajo, demostramos que la sobreexpresión de RAC3 en la línea celular

HEK293 induce la expresión de SNAIL y que este efecto es potenciado por el estímulo con TNF, lo cual correlaciona con una disminución en los niveles de E-Cadherina. Es interesante notar que esta respuesta fue inhibida por el pretratamiento con Sz. En concordancia con estos hallazgos, se ha demostrado que la inhibición de la actividad de NF- κ B por I κ Bss bloquea por completo la expresión de SNAIL y que mutantes negativos para IKK β muestran una inhibición parcial en los niveles de SNAIL luego del estímulo con TNF, demostrando que IKK β es necesaria para la estabilización de SNAIL (Wu et al., 2009).

Además ha sido reportado que TNF puede modular los niveles de Vimentina, a través de la unión directa de NF- κ B a su promotor (Rubio et al., 2012). En el presente trabajo demostramos que TNF potencia el efecto de RAC3 sobre el cambio en los niveles de Vimentina.

Al igual que en el desarrollo embrionario y remodelado de tejidos, la inducción de TEM en células tumorales, incrementa su motilidad e invasión (Peinado et al., 2007; Thiery and Sleeman, 2006). En el proceso de TEM las células adquieren propiedades de fibroblastos y muestran una adhesión intercelular reducida y aumento en la motilidad (Thiery and Sleeman, 2006). En el presente trabajo demostramos que la sobreexpresión de RAC3 induce un marcado cambio morfológico con células más ahusadas y baja adhesión entre células. El estímulo con TNF induce un marcado aumento en las proyecciones citoplasmáticas que correlaciona con un aumento en los niveles de Vimentina,

Si bien existen muchas evidencias que demuestran que TNF induce TEM en células tumorales (Wang et al., 2013) y que en consecuencia, participa en el proceso metastásico (Ji et al., 2014; Kitamura et al., 2015) es interesante el rol de RAC3 en esta respuesta mediada por TNF. En el presente trabajo demostramos, que la expresión de RAC3 es necesaria para que TNF induzca la expresión de Vimentina en células T47D y HeLa ya que el silenciamiento de RAC3, inhibe su expresión aún bajo el estímulo con TNF. Un caso particular y en relación al posible estado de activación por fosforilación de RAC3 bajo el estímulo de TNF, lo representa la línea T47D, la cual a pesar de sobre-expresar RAC3, en condiciones basales expresa bajos niveles de Vimentina y como es sabido tiene una baja capacidad migratoria e invasiva (De Larco et al., 2001; Liu et al., 2008). Sin embargo, el estímulo con TNF en esta línea celular induce un aumento de la expresión de Vimentina, demostrando que en esta línea celular, además de la sobreexpresión de RAC3, probablemente su estado de fosforilación vía la IKK activada por TNF (Wu et al., 2002) tendría relevancia para inducir los efectos observados.

Experimentos de cicatrización de la herida han demostrado que la TEM toma lugar en el frente de la herida (Neilson, 2006). Similarmente, este proceso ocurre en el frente invasivo de algunos tipos de cáncer (Yilmaz and Christofori, 2010). Estas observaciones sugieren que la habilidad migratoria e invasiva de células tumorales en el frente invasivo son iniciadas y propiciadas por un microambiente inflamatorio a través de la inducción de TEM (Wu et al., 2009; Wu and Zhou, 2010)

En el presente trabajo demostramos que la sobreexpresión de RAC3 es necesaria para que TNF induzca un aumento en la migración tanto en células HEK293 como en células tumorales que lo sobre-expresan naturalmente, ya que cuando los niveles de RAC3 son bajos o silenciados, el estímulo con TNF es incapaz de inducir la migración de dichas células y el mismo efecto fue observado en la expresión y actividad de MMP2 y 9, lo cual demuestra que TNF potenciaría el proceso invasivo asociado a la sobreexpresión de RAC3. Además, el estímulo conjunto de TNF con Sz inhibe por debajo de los niveles basales la capacidad migratoria, demostrando que la actividad IKK es necesaria para inducir la migración, no solo bajo el estímulo de TNF, sino que sería necesaria para el aumento en la migración inducida por la sola sobreexpresión de RAC3 en condiciones basales. Esta actividad podría estar asociada a la fosforilación de RAC3, I κ B y la consiguiente activación de NF- κ B, así como otros sustratos de la maquinaria motora celular (Sabio and Davis, 2014).

Ha sido reportado previamente que en células de cáncer gástrico y de colon el estímulo con TNF induce localización nuclear y activación de TCF/ β -Catenina a través de la supresión de la actividad de GSK3 β (Oguma et al., 2008). Además, ha sido reportado que TNF puede inducir TEM a través de un mecanismo que involucra la estabilización de SNAIL por inhibición de GSK3 β (Yook et al., 2006). A su vez, SNAIL puede aumentar la activación de la ruta Wnt por interacción con β -Catenina y de este modo establecer una retroalimentación positiva para la transcripción dependiente de Wnt (Stemmer et al., 2008). De hecho, tanto β -Catenina como SNAIL son sobre-expresados en las células tumorales del frente invasivo, donde los niveles de TNF son elevados (Wu et al., 2010).

En el presente trabajo demostramos que la sobreexpresión de RAC3 induce la expresión de SNAIL con la consecuente deslocalización de β -Catenina de la membrana plasmática. Además, el estímulo con TNF, induce la translocación de β -Catenina a núcleo sólo cuando RAC3 se encuentra sobreexpresado, tanto en células HEK293 como en las células tumorales T47D y HeLa, ya que cuando los niveles de RAC3 son bajos o silenciados, β -Catenina localiza preferentemente a nivel de la membrana plasmática. Ha sido previamente reportado que TNF puede estabilizar

β -Catenina ya sea por inhibición de GSK3 o por fosforilación directa de β -Catenina por IKK lo cual la estabiliza favoreciendo su translocación a núcleo. De acuerdo con esto, observamos que el pretratamiento con el inhibidor de IKK, Sz, inhibe completamente el efecto observado, demostrando que la actividad IKK es necesaria para la translocación de β -Catenina a núcleo. Es interesante remarcar que β -Catenina puede ser estabilizada por las mismas quinasas que conducen a la activación y estabilización de RAC3 (Wu et al., 2002). Si bien en este trabajo de tesis demostramos que la sobreexpresión de RAC3 conduce a un aumento en los niveles proteicos de β -Catenina, los mismos no fueron modificados bajo el tratamiento con TNF. Además, el pretratamiento con Sz tampoco genera cambios en la expresión, sugiriendo que la actividad IKK está involucrada en la estabilización/ translocación de β -Catenina a núcleo y no en la regulación de sus niveles de expresión.

Como se describió en la introducción de esta tesis, las vías TNF/NF- κ B, Wnt/ β -Catenina están involucradas en múltiples procesos y en particular en la inducción de TEM y en el mantenimiento de características de células madre tumorales (Dreesen and Brivanlou, 2007). En el presente trabajo demostramos que el estímulo con TNF induce ambas rutas de señalización cuando RAC3 se encuentra sobreexpresado. Más aún, ha sido reportado que CD44 puede ser regulado por ambas rutas de señalización (Smith et al., 2014). En relación a ello, hemos demostrado la sobreexpresión RAC3 es necesaria para la expresión de CD44 bajo el estímulo de TNF, demostrando que la sobreexpresión de RAC3 es clave en las respuestas mediadas por el microambiente inflamatorio tumoral, directamente sobre la adquisición de un fenotipo mesenquimático y probablemente a través de la modulación de genes involucrados en el mantenimiento de la población CMT.

Finalmente, podemos concluir que los resultados obtenidos en este trabajo de tesis constituyen un importante aporte en cuanto a la posible vinculación entre células madre pluripotentes y las CMT. Tal como ocurre con los genes típicos marcadores de pluripotencia y que se utilizan para la obtención de células pluripotentes inducidas, RAC3 parece ser otro marcador común de expresión detectable en células madre normales y en tumorales que favorece la oncogénesis a través de todos los mecanismos descritos en esta tesis y en los cuales, el contexto inflamatorio jugaría un rol importante contribuyendo a estos efectos.

Un aspecto relevante, altamente sugerente y abierto a investigaciones futuras es si precisamente los niveles elevados de RAC3 constituyen el nexo entre células madre normales residentes en tejidos y el origen de las CMT. Asumiendo que RAC3 los niveles de RAC3 deben bajar durante la diferenciación normal de células madre,

podría hipotetizarse, por ejemplo, la posibilidad de procesos de diferenciación fallidos, que conserven RAC3 elevado, en un nicho adecuado y que en un contexto de señales inflamatorias favorezca o promueva la generación de CMT. Si éste fuera el caso, la teoría del origen de las CMT a partir de stem normales podría ser considerada como más probable (esquematizado en la Figura 71). Por otro lado, de acuerdo a nuestros resultados, se ha podido lograr un perfil de CMT solamente sobre-expresando a RAC3 de modo constitutivo en una línea celular que no es stem. Sin embargo, por su naturaleza, de tipo embrionario a la vez que presenta características de células epiteliales y neuronales, también podría estar sustentando la teoría de la génesis de CMT a partir de células maduras diferenciadas. En este sentido, resultaría interesante investigar la posibilidad de transformación por sobreexpresión de RAC3 en otros tipos celulares derivados de tejidos normales, en los cuales, probablemente se requiera de una metodología más adecuada para la sobreexpresión de RAC3, utilizando vectores virales, dado que en general se transfectan con total ineficiencia. Luego, queda abierto el interrogante: así como se han logrado células pluripotentes inducidas solo expresando 4 genes marcadores de pluripotencia, ¿será factible obtener CMT a partir de células diferenciadas maduras de distintos tejidos humanos por expresión de RAC3 en combinación con 2 o 3 de los marcadores de pluripotencia conocidos? Sin duda, de resultar factible el desarrollo de estos estudios, sus implicancias para la investigación de futuras terapias personalizadas serían invaluable.

6. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, en términos generales podemos concluir:

A- La sobreexpresión de RAC3 parece ser una señal suficiente para la transformación de células originalmente no tumorales HEK293 en células con características tumorales.

Las propiedades adquiridas por sobreexpresión de RAC3 resultan compatibles con un fenotipo de célula madre tumoral.

Brevemente:

- La sobreexpresión de RAC3 confiere a las células HEK293 la capacidad de crecer en condiciones limitantes de factores de crecimiento. Esta característica podría deberse a la sobreexpresión de Ciclina E en condiciones reducidas de nutrientes.
- La sobreexpresión de RAC3 aumenta la capacidad clonogénica y formación de tumor-esferas en suspensión.
- La sobreexpresión de RAC3 aumenta la expresión de CD44 en la línea HEK293. Además, el análisis de subpoblaciones CD133+ y CD44+ obtenidas a partir de células tumorales, demuestra que existe una correlación entre estos marcadores y la sobreexpresión de RAC3.
- La sobreexpresión de RAC3 incrementa la expulsión de Hoechst lo cual se asocia a la presencia de células con características de célula madre tumoral, con expresión aumentada de proteínas MDR.
- En sintonía con el incremento en la expulsión de fluorocromo, la sobreexpresión de RAC3 correlaciona con el aumento en la expresión de la proteína ABCG2 involucrada en la resistencia a multidroga en células tumorales resistentes a distintos tipos de drogas quimioterapéuticas.
- La sobreexpresión de RAC3 inhibe la senescencia inducida por estrés genotóxico y metabólico.
- La expresión de RAC3 es necesaria para el mantenimiento de la actividad telomerasa en células tumorales.

- La sobreexpresión de RAC3 está asociada a un fenotipo mesenquimático con aumento de la capacidad migratoria e invasiva. Esto involucra cambios morfológicos, de contacto célula-célula y célula matriz y un cambio en el patrón de expresión de las proteínas Vimentina y Cadherinas además de la síntesis de metaloproteasas.

- La inoculación de células originalmente no tumorales pero sobre-expresando RAC3 en ratones nu/nu, si bien induce el crecimiento de tumores *in vivo*, éstos no logran establecerse y perdurar en el tiempo. Esto podría ser consecuencia de su naturaleza benigna, o bien, del requerimiento de señales adicionales en el entorno fisiológico necesarias para su crecimiento.

-

B- El entorno inflamatorio podría contribuir a la acción transformante oncogénica inducida por sobreexpresión de RAC3, por activación de la vía IKK, así como el aumento en la actividad transcripcional de NF- κ B y de β -Catenina-TCF/LIF, potenciando el fenotipo mesenquimático y migratorio.

Brevemente:

- TNF potencia los efectos de sobreexpresión de RAC3 en la adquisición del fenotipo mesenquimático con un aumento en la expresión de SNAIL y Vimentina y la represión de E-Cadherina.

- TNF aumenta la capacidad migratoria de células HEK293 que sobre-expresan RAC3, así como la de células tumorales que naturalmente sobre-expresan RAC3.

- Estas acciones biológicas son dependientes de la actividad IKK ya que el pretratamiento con Sz inhibe los efectos antes mencionados, pudiendo ser mediados en su totalidad por la vía NF- κ B así como por otros posibles sustratos de la IKK.

- La pérdida de E-Cadherina en células que sobre-expresan RAC3 aumenta la deslocalización de β -Catenina en la membrana plasmática y el estímulo con TNF induce su translocación a núcleo en un proceso dependiente de la actividad IKK.

- La sobreexpresión de RAC3 aumenta los niveles de β -Catenina totales, aunque el estímulo con TNF carece de efecto.

- El aumento en la translocación de β -Catenina a núcleo por estímulo con TNF correlaciona con el aumento en la actividad del factor de transcripción TCF/LEF y este efecto es revertido por el pretratamiento con inhibidor de IKK así como por cotransfección de I κ Bss indicando que la activación de NF- κ B es necesario para esta acción biológica.

- El aumento en la actividad de NF- κ B y TCF/LEF por estímulo con TNF correlaciona con el aumento en los niveles de CD44, gen blanco de ambos factores de transcripción.

En resumen, si bien estudios adicionales en otras líneas celulares no tumorales así como otros experimentos in vivo en un contexto inflamatorio podrían contribuir a la construcción de una conclusión más general, existen fuertes evidencias que sugieren:

La sola sobreexpresión de una molécula con capacidad de modificar la cromatina, afectando la expresión génica y que además tiene acciones citoplasmáticas, transforma células originalmente no oncogénicas en células iniciadoras de tumor y esa transformación involucra además, la adquisición de capacidades migratorias e invasivas por las cuales esas células en un contexto de señales adecuado serían capaces de iniciar la tumorigénesis. Las señales inflamatorias sistémicas o del microentorno tumoral podrían contribuir tanto en la génesis tumoral como en la proliferación, autoperpetuación y/ o diseminación de estas células, aumentando su capacidad migratoria y/o invasiva.

Bibliografía

- Abbott, R.A., Macdonald, D., Nambiar, S. and Davies, P.S. (2009) The association between walking to school, daily step counts and meeting step targets in 5- to 17-year-old Australian children. *Pediatr Exerc Sci*, **21**, 520-532.
- Acloque, H., Adams, M.S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M. and Nieto, M.A. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest*, **119**, 1438-1449.
- Adams, J.M. and Cory, S. (2007a) Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol*, **19**, 488-496.
- Adams, J.M. and Cory, S. (2007b) The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, **26**, 1324-1337.
- Aharinejad, S., Krenn, K., Zuckermann, A., Schafer, R., Gmeiner, M., Thomas, A., Aliabadi, A., Schneider, B. and Grimm, M. (2009a) Serum matrix metalloprotease-1 and vascular endothelial growth factor--a predict cardiac allograft rejection. *Am J Transplant*, **9**, 149-159.
- Aharinejad, S., Sioud, M., Lucas, T. and Abraham, D. (2009b) Targeting stromal-cancer cell interactions with siRNAs. *Methods Mol Biol*, **487**, 243-266.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J. and Clarke, M.F. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 3983-3988.
- Alvarado, C., Beitel, L.K., Sircar, K., Aprikian, A., Trifiro, M. and Gottlieb, B. (2005) Somatic mosaicism and cancer: a micro-genetic examination into the role of the androgen receptor gene in prostate cancer. *Cancer Res*, **65**, 8514-8518.
- Alvarado, C.V., Rubio, M.F., Fernandez Larrosa, P.N., Panelo, L., Azurmendi, P.J., Ruiz Grecco, M., Martínez-Noël, G.A. and Costas, M.A. (2014) The levels of RAC3 expression are up regulated by TNF in the inflammatory response. *FEBS Open Bio*, **4**, 450-457.
- Allen, M.D., Vaziri, R., Green, M., Chelala, C., Brentnall, A.R., Dreger, S., Vallath, S., Nitch-Smith, H., Hayward, J., Carpenter, R., Holliday, D.L., Walker, R.A., Hart, I.R. and Jones, J.L. (2011) Clinical and functional significance of alpha9beta1 integrin expression in breast cancer: a novel cell-surface marker of the basal phenotype that promotes tumour cell invasion. *J Pathol*, **223**, 646-658.
- Amin, S.B., Orlando, M., Eddins, A., MacDonald, M., Monczynski, C. and Wang, H. (2010) In utero iron status and auditory neural maturation in premature infants as evaluated by auditory brainstem response. *J Pediatr*, **156**, 377-381.
- Ansieau, S. and Collin, G. (2015) Senescence versus apoptosis in chemotherapy. *Oncotarget*, **6**, 4551-4552.
- Anwar, T.E. and Kleer, C.G. (2013) Tissue-based identification of stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. *Hum Pathol*, **44**, 1457-1464.
- Anzick, S., Kononen, J., Walker, R., Azorsa, D., Tanner, M., Guan, X., Sauter, G., Kallioniemi, O., Trent, J. and Meltzer, P. (1997) AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*, **277**, 965-968.
- Arimura, A., vn Peer, M., Schroder, A.J. and Rothman, P.B. (2004) The transcriptional co-activator p/CIP (NCoA-3) is up-regulated by STAT6 and serves as a positive regulator of transcriptional activation by STAT6. *J Biol Chem*, **279**, 31105-31112.
- Armstrong, L., Hughes, O., Yung, S., Hyslop, L., Stewart, R., Wappler, I., Peters, H., Walter, T., Stojkovic, P., Evans, J., Stojkovic, M. and Lako, M. (2006) The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NFkappabeta signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. *Hum Mol Genet*, **15**, 1894-1913.
- Avivar, A., Garcia-Macias, M.C., Ascaso, E., Herrera, G., O'Connor, J.E. and Font de Mora, J. (2006) Moderate overexpression of AIB1 triggers pre-neoplastic changes in mammary epithelium. *FEBS Lett*, **580**, 5222-5226.
- Bae, K.M., Su, Z., Frye, C., McClellan, S., Allan, R.W., Andrejewski, J.T., Kelley, V., Jorgensen, M., Steindler, D.A., Vieweg, J. and Siemann, D.W. (2010) Expression of pluripotent stem cell reprogramming factors by prostate tumor initiating cells. *J Urol*, **183**, 2045-2053.

- Bakkar, N. and Guttridge, D.C. (2010) NF-kappaB signaling: a tale of two pathways in skeletal myogenesis. *Physiol Rev*, **90**, 495-511.
- Balaguer, F., Link, A., Lozano, J.J., Cuatrecasas, M., Nagasaka, T., Boland, C.R. and Goel, A. (2010) Epigenetic silencing of miR-137 is an early event in colorectal carcinogenesis. *Cancer Res*, **70**, 6609-6618.
- Baldwin, A.S. (2001) Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest*, **107**, 241-246.
- Balkwill, F. (2009) Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer*, **9**, 361-371.
- Bargou, R.C., Leng, C., Krappmann, D., Emmerich, F., Mapara, M.Y., Bommert, K., Royer, H.D., Scheidereit, C. and Dorken, B. (1996) High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood*, **87**, 4340-4347.
- Basakran, N.S. (2015) CD44 as a potential diagnostic tumor marker. *Saudi Med J*, **36**, 273-279.
- Bashash, D., Ghaffari, S.H., Zaker, F., Hezave, K., Kazerani, M., Ghavamzadeh, A., Alimoghaddam, K., Mosavi, S.A., Gharehbaghian, A. and Vossough, P. (2012) Direct short-term cytotoxic effects of BIBR 1532 on acute promyelocytic leukemia cells through induction of p21 coupled with downregulation of c-Myc and hTERT transcription. *Cancer Invest*, **30**, 57-64.
- Basseres, D.S., Ebbs, A., Levantini, E. and Baldwin, A.S. (2010) Requirement of the NF-kappaB subunit p65/RelA for K-Ras-induced lung tumorigenesis. *Cancer Res*, **70**, 3537-3546.
- Behr, B., Ko, S.H., Wong, V.W., Gurtner, G.C. and Longaker, M.T. (2010) Stem cells. *Plast Reconstr Surg*, **126**, 1163-1171.
- Belandia, B. and Parker, M.G. (2000) Functional interaction between the p160 coactivator proteins and the transcriptional enhancer factor family of transcription factors. *J Biol Chem*, **275**, 30801-30805.
- Ben-Porath, I. and Weinberg, R.A. (2004) When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest*, **113**, 8-13.
- Ben-Porath, I. and Weinberg, R.A. (2005) The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol*, **37**, 961-976.
- Benito, P., Caballero, J., Moreno, J., Gutierrez-Alcantara, C., Munoz, C., Rojo, G., Garcia, S. and Soriguer, F.C. (2006) Effects of milk enriched with omega-3 fatty acid, oleic acid and folic acid in patients with metabolic syndrome. *Clin Nutr*, **25**, 581-587.
- Benway, B.M., Wang, A.J., Cabello, J.M. and Bhayani, S.B. (2009) Robotic partial nephrectomy with sliding-clip renorrhaphy: technique and outcomes. *Eur Urol*, **55**, 592-599.
- Bertoli, C., Skotheim, J.M. and de Bruin, R.A. (2013) Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **14**, 518-528.
- Boland, M.J., Hazen, J.L., Nazor, K.L., Rodriguez, A.R., Gifford, W., Martin, G., Kupriyanov, S. and Baldwin, K.K. (2009) Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature*, **461**, 91-94.
- Bolos, V., Peinado, H., Perez-Moreno, M.A., Fraga, M.F., Esteller, M. and Cano, A. (2003) The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci*, **116**, 499-511.
- Boominathan, L. (2010) The guardians of the genome (p53, TA-p73, and TA-p63) are regulators of tumor suppressor miRNAs network. *Cancer Metastasis Rev*, **29**, 613-639.
- Bouras, T., Southey, M.C. and Venter, D.J. (2001) Overexpression of the steroid receptor coactivator AIB1 in breast cancer correlates with the absence of estrogen and progesterone receptors and positivity for p53 and HER2/neu. *Cancer Res*, **61**, 903-907.
- Bourguignon, L.Y., Spevak, C.C., Wong, G., Xia, W. and Gilad, E. (2009a) Hyaluronan-CD44 interaction with protein kinase C(epsilon) promotes oncogenic signaling by the stem cell marker Nanog and the Production of microRNA-21, leading to down-regulation of the tumor suppressor protein PDCD4, anti-apoptosis, and chemotherapy resistance in breast tumor cells. *J Biol Chem*, **284**, 26533-26546.
- Bourguignon, L.Y., Xia, W. and Wong, G. (2009b) Hyaluronan-mediated CD44 interaction with p300 and SIRT1 regulates beta-catenin signaling and NFkappaB-specific transcription activity leading to MDR1 and Bcl-xL gene expression and chemoresistance in breast tumor cells. *J Biol Chem*, **284**, 2657-2671.
- Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F. and Kirchner, T. (2005) Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer*, **5**, 744-749.

- Brivanlou, A.H., Gage, F.H., Jaenisch, R., Jessell, T., Melton, D. and Rossant, J. (2003) Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells. *Science*, **300**, 913-916.
- Brunt, K.R., Weisel, R.D. and Li, R.K. (2012) Stem cells and regenerative medicine - future perspectives. *Can J Physiol Pharmacol*, **90**, 327-335.
- Bruzzone, A., Pinero, C.P., Castillo, L.F., Sarappa, M.G., Rojas, P., Lanari, C. and Luthy, I.A. (2008) Alpha(2)-Adrenoceptor action on cell proliferation and mammary tumour growth in mice. *Br J Pharmacol*, **155**, 494-504.
- Budanov, A.V. and Karin, M. (2008) p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*, **134**, 451-460.
- Buergy, D., Wenz, F., Groden, C. and Brockmann, M.A. (2012) Tumor-platelet interaction in solid tumors. *Int J Cancer*, **130**, 2747-2760.
- Burkhardt, D.L. and Sage, J. (2008) Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*, **8**, 671-682.
- Caan, B.J., Emond, J.A., Natarajan, L., Castillo, A., Gunderson, E.P., Habel, L., Jones, L., Newman, V.A., Rock, C.L., Slaterry, M.L., Stefanick, M.L., Sternfeld, B., Thomson, C.A. and Pierce, J.P. (2006) Post-diagnosis weight gain and breast cancer recurrence in women with early stage breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, **99**, 47-57.
- Cai, D., Shames, D.S., Raso, M.G., Xie, Y., Kim, Y.H., Pollack, J.R., Girard, L., Sullivan, J.P., Gao, B., Peyton, M., Nanjundan, M., Byers, L., Heymach, J., Mills, G., Gazdar, A.F., Wistuba, I., Kodadek, T. and Minna, J.D. (2007) Steroid receptor coactivator-3 expression in lung cancer and its role in the regulation of cancer cell survival and proliferation. *Cancer Res*, **70**, 6477-6485.
- Califano, J., van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., Corio, R., Lee, D., Greenberg, B., Koch, W. and Sidransky, D. (1996) Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*, **56**, 2488-2492.
- Campbell, P.J., Pleasance, E.D., Stephens, P.J., Dicks, E., Rance, R., Goodhead, I., Follows, G.A., Green, A.R., Futreal, P.A. and Stratton, M.R. (2008) Subclonal phylogenetic structures in cancer revealed by ultra-deep sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 13081-13086.
- Campisi, J. (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*, **120**, 513-522.
- Campisi, J. (2013) Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*, **75**, 685-705.
- Campisi, J., Andersen, J.K., Kapahi, P. and Melov, S. (2011) Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol*, **21**, 354-359.
- Campisi, J. and d'Adda di Fagagna, F. (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 729-740.
- Canepa, E.T., Scassa, M.E., Ceruti, J.M., Marazita, M.C., Carcagno, A.L., Sirkin, P.F. and Ogara, M.F. (2007) INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life*, **59**, 419-426.
- Cano, A., Perez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F. and Nieto, M.A. (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*, **2**, 76-83.
- Carroll, R.S., Brown, M., Zhang, J., DiRenzo, J., Font De Mora, J. and Black, P.M. (2000) Expression of a subset of steroid receptor cofactors is associated with progesterone receptor expression in meningiomas. *Clin Cancer Res*, **6**, 3570-3575.
- Casey, R.C., Burleson, K.M., Skubitz, K.M., Pambuccian, S.E., Oegema, T.R., Jr., Ruff, L.E. and Skubitz, A.P. (2001) Beta 1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids. *Am J Pathol*, **159**, 2071-2080.
- Colo, G.P., Rosato, R.R., Grant, S. and Costas, M.A. (2007) RAC3 down-regulation sensitizes human chronic myeloid leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett*, **581**, 5075-5081.
- Colo, G.P., Rubio, M.F., Nojek, I.M., Werbach, S.E., Echeverria, P.C., Alvarado, C.V., Nahmod, V.E., Galigniana, M.D. and Costas, M.A. (2008) The p160 nuclear receptor co-activator RAC3 exerts an anti-apoptotic role through a cytoplasmatic action. *Oncogene*, **27**, 2430-2444.
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. and Mantovani, A. (2009) Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, **30**, 1073-1081.

- Collado, M., Blasco, M.A. and Serrano, M. (2007) Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*, **130**, 223-233.
- Collado, M. and Serrano, M. (2005) The senescent side of tumor suppression. *Cell Cycle*, **4**, 1722-1724.
- Collado, M. and Serrano, M. (2010) Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer*, **10**, 51-57.
- Coronado, D., Godet, M., Bourillot, P.Y., Tapponnier, Y., Bernat, A., Petit, M., Afanassieff, M., Markossian, S., Malashicheva, A., Iacone, R., Anastassiadis, K. and Savatier, P. (2012) A short G1 phase is an intrinsic determinant of naive embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cell Res*, **10**, 118-131.
- Costas, M., Trapp, T., Pereda, M.P., Sauer, J., Rupprecht, R., Nahmod, V.E., Reul, J.M., Holsboer, F. and Arzt, E. (1996) Molecular and functional evidence for in vitro cytokine enhancement of human and murine target cell sensitivity to glucocorticoids. TNF-alpha priming increases glucocorticoid inhibition of TNF-alpha-induced cytotoxicity/apoptosis. *J Clin Invest*, **98**, 1409-1416.
- Chaturvedi, M.M., Sung, B., Yadav, V.R., Kannappan, R. and Aggarwal, B.B. (2011) NF-kappaB addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. *Oncogene*, **30**, 1615-1630.
- Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S.S., Huang, S.M., Schurter, B.T., Aswad, D.W. and Stallcup, M.R. (1999) Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science*, **284**, 2174-2177.
- Chen, J.H., Hales, C.N. and Ozanne, S.E. (2007) DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic Acids Res*, **35**, 7417-7428.
- Chen, K.G., Mallon, B.S., McKay, R.D. and Robey, P.G. (2014) Human pluripotent stem cell culture: considerations for maintenance, expansion, and therapeutics. *Cell Stem Cell*, **14**, 13-26.
- Chen, Q., Shi, X., Rudolph, C., Yu, Y., Zhang, D., Zhao, X., Mai, S., Wang, G., Schlegelberger, B. and Shi, Q. (2011) Recurrent trisomy and Robertsonian translocation of chromosome 14 in murine iPS cell lines. *Chromosome Res*, **19**, 857-868.
- Chen, S.L., Wang, S.C., Hosking, B. and Muscat, G.E. (2001) Subcellular localization of the steroid receptor coactivators (SRCs) and MEF2 in muscle and rhabdomyosarcoma cells. *Mol Endocrinol*, **15**, 783-796.
- Cheng, G.Y., Ni, G.H. and Jiang, F.C. (2009) [Pharmacophore model of integrin alphavbeta3 antagonists]. *Yao Xue Xue Bao*, **44**, 379-385.
- Chew, V., Tow, C., Teo, M., Wong, H.L., Chan, J., Gehring, A., Loh, M., Bolze, A., Quek, R., Lee, V.K., Lee, K.H., Abastado, J.P., Toh, H.C. and Nardin, A. (2010) Inflammatory tumour microenvironment is associated with superior survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol*, **52**, 370-379.
- Chitilian, J.M., Thillainadesan, G., Manias, J.L., Chang, W.Y., Walker, E., Isovici, M., Stanford, W.L. and Torchia, J. (2014) Critical components of the pluripotency network are targets for the p300/CBP interacting protein (p/CIP) in embryonic stem cells. *Stem Cells*, **32**, 204-215.
- Chomel, J.C. and Turhan, A.G. (2011) Chronic myeloid leukemia stem cells in the era of targeted therapies: resistance, persistence and long-term dormancy. *Oncotarget*, **2**, 713-727.
- Chung, A.C., Zhou, S., Liao, L., Tien, J.C., Greenberg, N.M. and Xu, J. (2007) Genetic ablation of the amplified-in-breast cancer 1 inhibits spontaneous prostate cancer progression in mice. *Cancer Res*, **67**, 5965-5975.
- Darimont, B.D., Wagner, R.L., Apriletti, J.W., Stallcup, M.R., Kushner, P.J., Baxter, J.D., Fletterick, R.J. and Yamamoto, K.R. (1998) Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev*, **12**, 3343-3356.
- Davalos, A.R., Coppe, J.P., Campisi, J. and Desprez, P.Y. (2010) Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*, **29**, 273-283.
- De Larco, J.E., Wuertz, B.R., Rosner, K.A., Erickson, S.A., Gamache, D.E., Manivel, J.C. and Furcht, L.T. (2001) A potential role for interleukin-8 in the metastatic phenotype of breast carcinoma cells. *Am J Pathol*, **158**, 639-646.
- de Visser, K.E. and Coussens, L.M. (2006) The inflammatory tumor microenvironment and its impact on cancer development. *Contrib Microbiol*, **13**, 118-137.
- Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J.D., Campisi, J. and Toussaint, O. (2009) Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*, **4**, 1798-1806.

- Degen, J.L. and Palumbo, J.S. (2012) Hemostatic factors, innate immunity and malignancy. *Thromb Res*, **129 Suppl 1**, S1-5.
- Dejardin, E., Derewowski, V., Chapelier, M., Jacobs, N., Gielen, J., Merville, M.P. and Bours, V. (1999) Regulation of NF-kappaB activity by I kappaB-related proteins in adenocarcinoma cells. *Oncogene*, **18**, 2567-2577.
- DeNardo, D.G., Andreu, P. and Coussens, L.M. (2010) Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev*, **29**, 309-316.
- Devalaraja, M.N., Wang, D.Z., Ballard, D.W. and Richmond, A. (1999) Elevated constitutive I kappaB kinase activity and I kappaB-alpha phosphorylation in Hs294T melanoma cells lead to increased basal MGSA/GRO-alpha transcription. *Cancer Res*, **59**, 1372-1377.
- Dick, J.E. (2009) Looking ahead in cancer stem cell research. *Nat Biotechnol*, **27**, 44-46.
- Dimauro, T. and David, G. (2009) Chromatin modifications: the driving force of senescence and aging? *Aging (Albany NY)*, **1**, 182-190.
- Dimri, G.P. (2005) What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell*, **7**, 505-512.
- Ding, X.F., Anderson, C.M., Ma, H., Hong, H., Uht, R.M., Kushner, P.J. and Stallcup, M.R. (1998) Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): multiple motifs with different binding specificities. *Mol Endocrinol*, **12**, 302-313.
- Diotti, R. and Loayza, D. (2011) Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus*, **2**, 119-135.
- Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., Wang, Y.Y., Meulle, A., Salles, B., Le Gonidec, S., Garrido, I., Escourrou, G., Valet, P. and Muller, C. (2011) Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res*, **71**, 2455-2465.
- Dolecek, C., Tran, T.P., Nguyen, N.R., Le, T.P., Ha, V., Phung, Q.T., Doan, C.D., Nguyen, T.B., Duong, T.L., Luong, B.H., Nguyen, T.A., Pham, N.D., Mai, N.L., Phan, V.B., Vo, A.H., Nguyen, V.M., Tran, T.T., Tran, T.C., Schultsz, C., Dunstan, S.J., Stepniewska, K., Campbell, J.I., To, S.D., Basnyat, B., Nguyen, V.V., Nguyen, V.S., Nguyen, T.C., Tran, T.H. and Farrar, J. (2008) A multi-center randomised controlled trial of gatifloxacin versus azithromycin for the treatment of uncomplicated typhoid fever in children and adults in Vietnam. *PLoS One*, **3**, e2188.
- Dreesen, O. and Brivanlou, A.H. (2007) Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells. *Stem Cell Rev*, **3**, 7-17.
- Durrett, R., Foo, J., Leder, K., Mayberry, J. and Michor, F. (2011) Intratumor heterogeneity in evolutionary models of tumor progression. *Genetics*, **188**, 461-477.
- Dvorak, P., Dvorakova, D., Koskova, S., Vodinska, M., Najvirtova, M., Krekac, D. and Hampl, A. (2005) Expression and potential role of fibroblast growth factor 2 and its receptors in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, **23**, 1200-1211.
- Easton, J.B. and Houghton, P.J. (2006) mTOR and cancer therapy. *Oncogene*, **25**, 6436-6446.
- Ebben, J.D., Zorniak, M., Clark, P.A. and Kuo, J.S. (2011) Introduction to induced pluripotent stem cells: advancing the potential for personalized medicine. *World Neurosurg*, **76**, 270-275.
- Eger, A., Aigner, K., Sonderegger, S., Dampier, B., Oehler, S., Schreiber, M., Berx, G., Cano, A., Beug, H. and Foisner, R. (2005) DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene*, **24**, 2375-2385.
- Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H.U. and Kimchi, A. (2009) Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ*, **16**, 966-975.
- Eyler, C.E. and Rich, J.N. (2008) Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol*, **26**, 2839-2845.
- Falandry, C., Bonnefoy, M., Freyer, G. and Gilson, E. (2014) Biology of cancer and aging: a complex association with cellular senescence. *J Clin Oncol*, **32**, 2604-2610.
- Fereshteh, M.P., Tilli, M.T., Kim, S.E., Xu, J., O'Malley, B.W., Wellstein, A., Furth, P.A. and Riegel, A.T. (2008) The nuclear receptor coactivator amplified in breast cancer-1 is required for Neu (ErbB2/HER2) activation, signaling, and mammary tumorigenesis in mice. *Cancer Res*, **68**, 3697-3706.
- Fernandez Larrosa, P.N., Alvarado, C.V., Rubio, M.F., Ruiz Grecco, M., Micenmacher, S., Martinez-Noel, G.A., Panelo, L. and Costas, M.A. (2012) Nuclear receptor coactivator RAC3 inhibits autophagy. *Cancer Sci*, **103**, 2064-2071.

- Fernandez Larrosa, P.N., Ruiz Grecco, M., Mengual Gomez, D., Alvarado, C.V., Panelo, L.C., Rubio, M.F., Alonso, D.F., Gomez, D.E. and Costas, M.A. (2015) RAC3 more than a nuclear receptor coactivator: a key inhibitor of senescence that is downregulated in aging. *Cell Death Dis*, **6**, e1902.
- Ferrara, N., Gerber, H.P. and LeCouter, J. (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, **9**, 669-676.
- Florian, M.C. and Geiger, H. (2010) Concise review: polarity in stem cells, disease, and aging. *Stem Cells*, **28**, 1623-1629.
- Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D. and Semenza, G.L. (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, **16**, 4604-4613.
- Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., Koizumi, M., Masui, T., Kawaguchi, M., Takaori, K., Doi, R., Nishi, E., Kakinoki, R., Deng, J.M., Behringer, R.R., Nakamura, T. and Uemoto, S. (2011) Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet*, **43**, 34-41.
- Gao, D., Nolan, D.J., Mellick, A.S., Bambino, K., McDonnell, K. and Mittal, V. (2008) Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science*, **319**, 195-198.
- Gee, K., Kryworuchko, M. and Kumar, A. (2004) Recent advances in the regulation of CD44 expression and its role in inflammation and autoimmune diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, **52**, 13-26.
- Gerber, H.P. and Ferrara, N. (2003) The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis. *J Mol Med (Berl)*, **81**, 20-31.
- Ghosh, S. and Karin, M. (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, **109 Suppl**, S81-96.
- Gilmore, T.D., Koedood, M., Piffat, K.A. and White, D.W. (1996) Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer. *Oncogene*, **13**, 1367-1378.
- Gill, G. and Ptashne, M. (1988) Negative effect of the transcriptional activator GAL4. *Nature*, **334**, 721-724.
- Giorgetti, A., Montserrat, N., Aasen, T., Gonzalez, F., Rodriguez-Piza, I., Vassena, R., Raya, A., Boue, S., Barrero, M.J., Corbella, B.A., Torradella, M., Veiga, A. and Izpisua Belmonte, J.C. (2009) Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell*, **5**, 353-357.
- Gnanapragasam, V.J., Leung, H.Y., Pulimood, A.S., Neal, D.E. and Robson, C.N. (2001) Expression of RAC 3, a steroid hormone receptor co-activator in prostate cancer. *Br J Cancer*, **85**, 1928-1936.
- Gocheva, V., Wang, H.W., Gadea, B.B., Shree, T., Hunter, K.E., Garfall, A.L., Berman, T. and Joyce, J.A. (2010) IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev*, **24**, 241-255.
- Gordon, R.R. and Nelson, P.S. (2012) Cellular senescence and cancer chemotherapy resistance. *Drug Resist Updat*, **15**, 123-131.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R. and Karin, M. (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, **140**, 883-899.
- Grivennikov, S.I. and Karin, M. (2010) Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. *Curr Opin Genet Dev*, **20**, 65-71.
- Grumolato, L., Liu, G., Haremak, T., Mungamuri, S.K., Mong, P., Akiri, G., Lopez-Bergami, P., Arita, A., Anouar, Y., Mlodzik, M., Ronai, Z.A., Brody, J., Weinstein, D.C. and Aaronson, S.A. (2013) beta-Catenin-independent activation of TCF1/LEF1 in human hematopoietic tumor cells through interaction with ATF2 transcription factors. *PLoS Genet*, **9**, e1003603.
- Guttridge, D.C., Albanese, C., Reuther, J.Y., Pestell, R.G. and Baldwin JR., A.S. (1999) NF-kB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 5785-5799.
- Hall, P.A. and Watt, F.M. (1989) Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development*, **106**, 619-633.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**, 646-674.

- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, **75**, 805-816.
- Hay, N. (2005) The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell*, **8**, 179-183.
- Heldin, C.H. (2012) Autocrine PDGF stimulation in malignancies. *Ups J Med Sci*, **117**, 83-91.
- Henke, R.T., Haddad, B.R., Kim, S.E., Rone, J.D., Mani, A., Jessup, J.M., Wellstein, A., Maitra, A. and Riegel, A.T. (2004) Overexpression of the nuclear receptor coactivator AIB1 (SRC-3) during progression of pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, **10**, 6134-6142.
- Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P., Chen, D.J. and Sedivy, J.M. (2004) Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell*, **14**, 501-513.
- Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A., Heder, A., Scheidereit, C. and Strauss, M. (1999) NF- κ B function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 2690-2698.
- Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D.B. and Johnston, P.G. (2013) Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*, **13**, 714-726.
- Holliday, D.L. and Speirs, V. (2011) Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*, **13**, 215.
- Hong, H., Kohli, K., Garabedian, M.J. and Stallcup, M.R. (1997) GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. *Mol Cell Biol*, **17**, 2735-2744.
- Horak, P., Crawford, A.R., Vadysirissack, D.D., Nash, Z.M., DeYoung, M.P., Sgroi, D. and Ellisen, L.W. (2010) Negative feedback control of HIF-1 through REDD1-regulated ROS suppresses tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 4675-4680.
- Horner, S.M., DeFilippis, R.A., Manuelidis, L. and DiMaio, D. (2004) Repression of the human papillomavirus E6 gene initiates p53-dependent, telomerase-independent senescence and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *J Virol*, **78**, 4063-4073.
- Ingham, P.W. and McMahon, A.P. (2001) Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*, **15**, 3059-3087.
- Itahana, K., Campisi, J. and Dimri, G.P. (2004) Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology*, **5**, 1-10.
- Ivascu, A. and Kubbies, M. (2007) Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids. *Int J Oncol*, **31**, 1403-1413.
- Jackson, R.S., 2nd, Placzek, W., Fernandez, A., Ziaee, S., Chu, C.Y., Wei, J., Stebbins, J., Kitada, S., Fritz, G., Reed, J.C., Chung, L.W., Pellecchia, M. and Bhowmick, N.A. (2012) Sabutoclax, a Mcl-1 antagonist, inhibits tumorigenesis in transgenic mouse and human xenograft models of prostate cancer. *Neoplasia*, **14**, 656-665.
- James, D., Levine, A.J., Besser, D. and Hemmati-Brivanlou, A. (2005) TGF β /activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development*, **132**, 1273-1282.
- Ji, H., Cao, R., Yang, Y., Zhang, Y., Iwamoto, H., Lim, S., Nakamura, M., Andersson, P., Wang, J., Sun, Y., Dissing, S., He, X., Yang, X. and Cao, Y. (2014) TNFR1 mediates TNF- α -induced tumour lymphangiogenesis and metastasis by modulating VEGF-C-VEGFR3 signalling. *Nat Commun*, **5**, 4944.
- Ji, H., Ehrlich, L.I., Seita, J., Murakami, P., Doi, A., Lindau, P., Lee, H., Aryee, M.J., Irizarry, R.A., Kim, K., Rossi, D.J., Inlay, M.A., Serwold, T., Karsunky, H., Ho, L., Daley, G.Q., Weissman, I.L. and Feinberg, A.P. (2010) Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors. *Nature*, **467**, 338-342.
- Jiang, H. and Edgar, B.A. (2009) EGFR signaling regulates the proliferation of Drosophila adult midgut progenitors. *Development*, **136**, 483-493.
- Jin, Z. and El-Deiry, W.S. (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*, **4**, 139-163.
- Johnston, D.A., Dong, B. and Hughes, C.C. (2009) TNF induction of jagged-1 in endothelial cells is NF κ B-dependent. *Gene*, **435**, 36-44.
- Jones, D.L. and Wagers, A.J. (2008) No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 11-21.
- Julien, S., Puig, I., Caretti, E., Bonaventure, J., Nelles, L., van Roy, F., Dargemont, C., de Herreros, A.G., Bellacosa, A. and Larue, L. (2007) Activation of NF- κ B by Akt

- upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition. *Oncogene*, **26**, 7445-7456.
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M. and Ohsumi, Y. (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol*, **150**, 1507-1513.
- Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R. and Weinberg, R.A. (2007) Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, **449**, 557-563.
- Kessenbrock, K., Plaks, V. and Werb, Z. (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, **141**, 52-67.
- Kim, J.B., Greber, B., Arauzo-Bravo, M.J., Meyer, J., Park, K.I., Zaehres, H. and Scholer, H.R. (2009) Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature*, **461**, 649-643.
- Kimmelman, A.C. (2011) The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev*, **25**, 1999-2010.
- Kirstetter, P., Anderson, K., Porse, B.T., Jacobsen, S.E. and Nerlov, C. (2006) Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol*, **7**, 1048-1056.
- Kitamura, T., Qian, B.Z. and Pollard, J.W. (2015) Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol*, **15**, 73-86.
- Klein, S., de Fougères, A.R., Blaikie, P., Khan, L., Pepe, A., Green, C.D., Kotliansky, V. and Giancotti, F.G. (2002) Alpha 5 beta 1 integrin activates an NF-kappa B-dependent program of gene expression important for angiogenesis and inflammation. *Mol Cell Biol*, **22**, 5912-5922.
- Knudson, A.G. (2001) Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*, **1**, 157-162.
- Koh, S.S., Chen, D., Lee, Y.H. and Stallcup, M.R. (2001) Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. *J Biol Chem*, **276**, 1089-1098.
- Koide, N., Yasuda, K., Kadomatsu, K. and Takei, Y. (2012) Establishment and optimal culture conditions of microrna-induced pluripotent stem cells generated from HEK293 cells via transfection of microrna-302s expression vector. *Nagoya J Med Sci*, **74**, 157-165.
- Koren, I., Reem, E. and Kimchi, A. DAP1, a novel substrate of mTOR, negatively regulates autophagy. *Curr Biol*, **20**, 1093-1098.
- Krstic, J. and Santibanez, J.F. (2014) Transforming growth factor-beta and matrix metalloproteinases: functional interactions in tumor stroma-infiltrating myeloid cells. *ScientificWorldJournal*, **2014**, 521754.
- Kuang, S.Q., Liao, L., Wang, S., Medina, D., O'Malley, B.W. and Xu, J. (2005) Mice lacking the amplified in breast cancer 1/steroid receptor coactivator-3 are resistant to chemical carcinogen-induced mammary tumorigenesis. *Cancer Res*, **65**, 7993-8002.
- Kuang, S.Q., Liao, L., Zhang, H., Lee, A.V., O'Malley, B.W. and Xu, J. (2004) AIB1/SRC-3 deficiency affects insulin-like growth factor I signaling pathway and suppresses v-Ha-ras-induced breast cancer initiation and progression in mice. *Cancer Res*, **64**, 1875-1885.
- Kucia, M., Masternak, M., Liu, R., Shin, D.M., Ratajczak, J., Mierzejewska, K., Spong, A., Kopchick, J.J., Bartke, A. and Ratajczak, M.Z. (2012) The negative effect of prolonged somatotrophic/insulin signaling on an adult bone marrow-residing population of pluripotent very small embryonic-like stem cells (VSELs). *Age (Dordr)*, **35**, 315-330.
- Kucia, M. and Ratajczak, M.Z. (2006) Stem cells as a two edged sword--from regeneration to tumor formation. *J Physiol Pharmacol*, **57 Suppl 7**, 5-16.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J. and Peeper, D.S. (2010) The essence of senescence. *Genes Dev*, **24**, 2463-2479.
- Kulbe, H., Hagemann, T., Szlosarek, P.W., Balkwill, F.R. and Wilson, J.L. (2005) The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha regulates chemokine receptor expression on ovarian cancer cells. *Cancer Res*, **65**, 10355-10362.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A. and Dick, J.E. (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, **367**, 645-648.
- Lee, D.F., Kuo, H.P., Chen, C.T., Hsu, J.M., Chou, C.K., Wei, Y., Sun, H.L., Li, L.Y., Ping, B., Huang, W.C., He, X., Hung, J.Y., Lai, C.C., Ding, Q., Su, J.L., Yang, J.Y., Sahin, A.A., Hortobagyi, G.N., Tsai, F.J., Tsai, C.H. and Hung, M.C. (2007) IKK beta suppression of

- TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell*, **130**, 440-455.
- Levashova, Z.B., Plisov, S.Y. and Perantoni, A.O. (2003) Conditionally immortalized cell line of inducible metanephric mesenchyme. *Kidney Int*, **63**, 2075-2087.
- Levine, A.J. (1990) Tumor suppressor genes. *Bioessays*, **12**, 60-66.
- Levine, A.J. (1993) The tumor suppressor genes. *Annu Rev Biochem*, **62**, 623-651.
- Levine, A.J. and Momand, J. (1990) Tumor suppressor genes: the p53 and retinoblastoma sensitivity genes and gene products. *Biochim Biophys Acta*, **1032**, 119-136.
- Li, C., Wu, R.C., Amazit, L., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (2007a) Specific amino acid residues in the basic helix-loop-helix domain of SRC-3 are essential for its nuclear localization and proteasome-dependent turnover. *Mol Cell Biol*, **27**, 1296-1308.
- Li, F., Tiede, B., Massague, J. and Kang, Y. (2007b) Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res*, **17**, 3-14.
- Li, H. and Chen, J.D. (1998) The receptor-associated coactivator 3 activates transcription through CREB-binding protein recruitment and autoregulation. *J Biol Chem*, **273**, 5948-5954.
- Li, H., Gomes, P.J. and Chen, J.D. (1997a) RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8479-8484.
- Li, H., Gomes, P.J. and Chen, J.D. (1997b) RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8479-8484.
- Li, L. and Clevers, H. (2010) Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science*, **327**, 542-545.
- Lian, I., Kim, J., Okazawa, H., Zhao, J., Zhao, B., Yu, J., Chinnaiyan, A., Israel, M.A., Goldstein, L.S., Abujarour, R., Ding, S. and Guan, K.L. (2010) The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev*, **24**, 1106-1118.
- Liang, G. and Zhang, Y. (2013) Genetic and epigenetic variations in iPSCs: potential causes and implications for application. *Cell Stem Cell*, **13**, 149-159.
- Liang, X., Zheng, M., Jiang, J., Zhu, G., Yang, J. and Tang, Y. (2011) Hypoxia-inducible factor-1 alpha, in association with TWIST2 and SNIP1, is a critical prognostic factor in patients with tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, **47**, 92-97.
- Liao, J., Qian, F., Tchabo, N., Mhawech-Fauceglia, P., Beck, A., Qian, Z., Wang, X., Huss, W.J., Lele, S.B., Morrison, C.D. and Odunsi, K. (2014) Ovarian cancer spheroid cells with stem cell-like properties contribute to tumor generation, metastasis and chemotherapy resistance through hypoxia-resistant metabolism. *PLoS One*, **9**, e84941.
- Liao, L., Kuang, S.Q., Yuan, Y., Gonzalez, S.M., O'Malley, B.W. and Xu, J. (2002) Molecular structure and biological function of the cancer-amplified nuclear receptor coactivator SRC-3/AIB1. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **83**, 3-14.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engle, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S. and Johnson, J.M. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, **433**, 769-773.
- Lin, A. and Karin, M. (2003) NF- κ B in cancer: a marked target. *Cancer Biology*, **13**, 107-114.
- Lin, H.J., Tsai, F.J., Hung, P., Chen, W.C., Chen, H.Y., Fan, S.S. and Tsai, S.W. (2006) Association of E-cadherin gene 3'-UTR C/T polymorphism with primary open angle glaucoma. *Ophthalmic Res*, **38**, 44-48.
- List, H.J., Lauritsen, K.J., Reiter, R., Powers, C., Wellstein, A. and Riegel, A.T. (2001) Ribozyme targeting demonstrates that the nuclear receptor coactivator AIB1 is a rate-limiting factor for estrogen-dependent growth of human MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem*, **276**, 23763-23768.
- Liu, D.H., Chen, Y.M., Liu, Y., Hao, B.S., Zhou, B., Wu, L., Wang, M., Chen, L., Wu, W.K. and Qian, X.X. (2011) Rb1 protects endothelial cells from hydrogen peroxide-induced cell senescence by modulating redox status. *Biol Pharm Bull*, **34**, 1072-1077.
- Liu, Y.N., Liu, Y., Lee, H.J., Hsu, Y.H. and Chen, J.H. (2008) Activated androgen receptor downregulates E-cadherin gene expression and promotes tumor metastasis. *Mol Cell Biol*, **28**, 7096-7108.
- Liu, Z., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (2001) Sequential recruitment of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) and p300 enhances progesterone receptor-dependent initiation and reinitiation of transcription from chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12426-12431.

- Lobo, N.A., Shimono, Y., Qian, D. and Clarke, M.F. (2007) The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **23**, 675-699.
- Lonard, D.M. and O'Malley, B.W. (2006) The expanding cosmos of nuclear receptor coactivators. *Cell*, **125**, 411-414.
- Long, W., Yi, P., Amazit, L., LaMarca, H.L., Ashcroft, F., Kumar, R., Mancini, M.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (2010) SRC-3Delta4 mediates the interaction of EGFR with FAK to promote cell migration. *Mol Cell*, **37**, 321-332.
- Louie, M.C., Revenko, A.S., Zou, J.X., Yao, J. and Chen, H.W. (2006) Direct control of cell cycle gene expression by proto-oncogene product ACTR, and its autoregulation underlies its transforming activity. *Mol Cell Biol*, **26**, 3810-3823.
- Louie, M.C., Zou, J.X., Rabinovich, A. and Chen, H.W. (2004) ACTR/AIB1 functions as an E2F1 coactivator to promote breast cancer cell proliferation and antiestrogen resistance. *Mol Cell Biol*, **24**, 5157-5171.
- Ma, G., Ren, Y., Wang, K. and He, J. (2011a) SRC-3 has a role in cancer other than as a nuclear receptor coactivator. *Int J Biol Sci*, **7**, 664-672.
- Ma, S.G., Tang, W.Z., Yu, S.S., Chen, X.G., Liu, Y., Wang, W.J., Qu, J., Xu, S., Ren, J.H., Li, Y. and Lu, H.N. (2011b) Four new phenolic diglycosides from the roots of *Illicium oligandrum*. *Carbohydr Res*, **346**, 1165-1168.
- Maitland, N.J. and Collins, A.T. (2008) Prostate cancer stem cells: a new target for therapy. *J Clin Oncol*, **26**, 2862-2870.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. and Balkwill, F. (2008) Cancer-related inflammation. *Nature*, **454**, 436-444.
- Mao, Y., Keller, E.T., Garfield, D.H., Shen, K. and Wang, J. (2013) Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*, **32**, 303-315.
- Maret, D., Gruzglin, E., Sadr, M.S., Siu, V., Shan, W., Koch, A.W., Seidah, N.G., Del Maestro, R.F. and Colman, D.R. (2010) Surface expression of precursor N-cadherin promotes tumor cell invasion. *Neoplasia*, **12**, 1066-1080.
- Martin, N., Beach, D. and Gil, J. (2014) Ageing as developmental decay: insights from p16. *Trends Mol Med*, **20**, 667-674.
- Martin, T.A., Goyal, A., Watkins, G. and Jiang, W.G. (2005) Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. *Ann Surg Oncol*, **12**, 488-496.
- Marusyk, A. and Polyak, K. (2010) Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta*, **1805**, 105-117.
- Masutomi, K. and Hahn, W.C. (2003) Telomerase expression--only half the story. *Cancer Biol Ther*, **2**, 685-686.
- Masutomi, K., Yu, E.Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J.L., Metz, G.B., Brooks, M.W., Kaneko, S., Murakami, S., DeCaprio, J.A., Weinberg, R.A., Stewart, S.A. and Hahn, W.C. (2003) Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell*, **114**, 241-253.
- Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V. and White, E. (2009a) Assessing metabolic stress and autophagy status in epithelial tumors. *Methods Enzymol*, **453**, 53-81.
- Mathew, R., Karp, C.M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinas, C., Dipaola, R.S., Karantza-Wadsworth, V. and White, E. (2009b) Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell*, **137**, 1062-1075.
- Mathew, R., Kongara, S., Beaudoin, B., Karp, C.M., Bray, K., Degenhardt, K., Chen, G., Jin, S. and White, E. (2007) Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev*, **21**, 1367-1381.
- Maxwell, P.H. (2005) The HIF pathway in cancer. *Semin Cell Dev Biol*, **16**, 523-530.
- McGrail, D.J., Mezencev, R., Kieu, Q.M., McDonald, J.F. and Dawson, M.R. (2015) SNAIL-induced epithelial-to-mesenchymal transition produces concerted biophysical changes from altered cytoskeletal gene expression. *FASEB J*, **29**, 1280-1289.
- McKenna, N.J., Xu, J., Nawaz, Z., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1999) Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **69**, 3-12.
- McNutt, L.A., Waltermaurer, E., Bednarczyk, R.A., Carlson, B.E., Kotval, J., McCauley, J., Campbell, J.C. and Ford, D.E. (2008) Are We Misjudging How Well Informed Consent Forms are Read? *J Empir Res Hum Res Ethics*, **3**, 89-97.
- Merlo, L.M., Pepper, J.W., Reid, B.J. and Maley, C.C. (2006) Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*, **6**, 924-935.

- Micalizzi, D.S., Farabaugh, S.M. and Ford, H.L. (2010) Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **15**, 117-134.
- Michalaki, V., Syrigos, K., Charles, P. and Waxman, J. (2004) Serum levels of IL-6 and TNF- α correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer*, **90**, 2312-2316.
- Milas, M., Yu, D., Sun, D. and Pollock, R.E. (1998) Telomerase activity of sarcoma cell lines and fibroblasts is independent of p53 status. *Clin Cancer Res*, **4**, 1573-1579.
- Mimeault, M. and Batra, S.K. (2008) Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. *Stem Cell Rev*, **4**, 27-49.
- Mimeault, M., Hauke, R. and Batra, S.K. (2007) Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther*, **82**, 252-264.
- Minet, E., Michel, G., Remacle, J. and Michiels, C. (2000) Role of HIF-1 as a transcription factor involved in embryonic development, cancer progression and apoptosis (review). *Int J Mol Med*, **5**, 253-259.
- Moitra, K. (2015) Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Stem Cells. *Biomed Res Int*, **2015**, 635745.
- Monteiro, J. and Fodde, R. (2010) Cancer stemness and metastasis: therapeutic consequences and perspectives. *Eur J Cancer*, **46**, 1198-1203.
- Moore, K.A. and Lemischka, I.R. (2006) Stem cells and their niches. *Science*, **311**, 1880-1885.
- Morrison, S.J. and Kimble, J. (2006) Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, **441**, 1068-1074.
- Morrison, S.J., Shah, N.M. and Anderson, D.J. (1997) Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, **88**, 287-298.
- Mukhopadhyay, T., Roth, J.A. and Maxwell, S.A. (1995) Altered expression of the p50 subunit of the NF-kappa B transcription factor complex in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene*, **11**, 999-1003.
- Mussi, P., Yu, C., O'Malley, B.W. and Xu, J. (2006) Stimulation of steroid receptor coactivator-3 (SRC-3) gene overexpression by a positive regulatory loop of E2F1 and SRC-3. *Mol Endocrinol*, **20**, 3105-3119.
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N. and Yamanaka, S. (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*, **26**, 101-106.
- Nardella, C., Clohessy, J.G., Alimonti, A. and Pandolfi, P.P. (2011) Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat Rev Cancer*, **11**, 503-511.
- Neilson, E.G. (2006) Mechanisms of disease: Fibroblasts--a new look at an old problem. *Nat Clin Pract Nephrol*, **2**, 101-108.
- Nieto, M.A. (2011) The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **27**, 347-376.
- Nowell, P.C. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, **194**, 23-28.
- O'Brien, T. and Barry, F.P. (2009) Stem cell therapy and regenerative medicine. *Mayo Clin Proc*, **84**, 859-861.
- Odorico, J.S., Kaufman, D.S. and Thomson, J.A. (2001) Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*, **19**, 193-204.
- Oguma, K., Oshima, H., Aoki, M., Uchio, R., Naka, K., Nakamura, S., Hirao, A., Saya, H., Taketo, M.M. and Oshima, M. (2008) Activated macrophages promote Wnt signalling through tumour necrosis factor- α in gastric tumour cells. *Embo J*, **27**, 1671-1681.
- Okita, K., Ichisaka, T. and Yamanaka, S. (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, **448**, 313-317.
- Onate, S.A., Boonyaratanakornkit, V., Spencer, T.E., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., Edwards, D.P. and O'Malley, B.W. (1998) The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem*, **273**, 12101-12108.
- Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science*, **270**, 1354-1357.
- Orosz, P., Echtenacher, B., Falk, W., Ruschoff, J., Weber, D. and Mannel, D.N. (1993) Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. *J Exp Med*, **177**, 1391-1398.

- Oskarsson, T., Batlle, E. and Massague, J. (2014) Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. *Cell Stem Cell*, **14**, 306-321.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F.T., Zhou, T.T., Liu, B. and Bao, J.K. (2012) Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*, **45**, 487-498.
- Paling, N.R., Wheadon, H., Bone, H.K. and Welham, M.J. (2004) Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J Biol Chem*, **279**, 48063-48070.
- Palumbo, J.S., Talmage, K.E., Massari, J.V., La Jeunesse, C.M., Flick, M.J., Kombrinck, K.W., Jirouskova, M. and Degen, J.L. (2005) Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood*, **105**, 178-185.
- Parker, B.S., Argani, P., Cook, B.P., Liangfeng, H., Chartrand, S.D., Zhang, M., Saha, S., Bardelli, A., Jiang, Y., St Martin, T.B., Nacht, M., Teicher, B.A., Klinger, K.W., Sukumar, S. and Madden, S.L. (2004) Alterations in vascular gene expression in invasive breast carcinoma. *Cancer Res*, **64**, 7857-7866.
- Paterlini-Brechot, P. (2014) About seed and soil. *Cancer Microenviron*, **7**, 91-93.
- Pauklin, S. and Vallier, L. (2013) The cell-cycle state of stem cells determines cell fate propensity. *Cell*, **155**, 135-147.
- Paulsson, J. and Micke, P. (2014) Prognostic relevance of cancer-associated fibroblasts in human cancer. *Semin Cancer Biol*, **25**, 61-68.
- Peinado, H., Lavotshkin, S. and Lyden, D. (2011a) The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol*, **21**, 139-146.
- Peinado, H., Olmeda, D. and Cano, A. (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*, **7**, 415-428.
- Peinado, J.R., Quiros, P.M., Pulido, M.R., Marino, G., Martinez-Chantar, M.L., Vazquez-Martinez, R., Freije, J.M., Lopez-Otin, C. and Malagon, M.M. (2011b) Proteomic profiling of adipose tissue from Zmpste24^{-/-} mice, a model of lipodystrophy and premature aging, reveals major changes in mitochondrial function and vimentin processing. *Mol Cell Proteomics*, **10**, M111 008094.
- Percharde, M. and Azuara, V. (2012) Essential roles for the nuclear receptor coactivator NcoA3 in pluripotency. *Cell Cycle*, **12**, 195-196.
- Percharde, M., Lavial, F., Ng, J.H., Kumar, V., Tomaz, R.A., Martin, N., Yeo, J.C., Gil, J., Prabhakar, S., Ng, H.H., Parker, M.G. and Azuara, V. (2012) NcoA3 functions as an essential Esrrb coactivator to sustain embryonic stem cell self-renewal and reprogramming. *Genes Dev*, **26**, 2286-2298.
- Piano, A. and Titorenko, V.I. (2015) The Intricate Interplay between Mechanisms Underlying Aging and Cancer. *Aging Dis*, **6**, 56-75.
- Pienta, K.J., Robertson, B.A., Coffey, D.S. and Taichman, R.S. (2013) The cancer diaspora: Metastasis beyond the seed and soil hypothesis. *Clin Cancer Res*, **19**, 5849-5855.
- Piscaglia, A.C. (2008) Stem cells, a two-edged sword: risks and potentials of regenerative medicine. *World J Gastroenterol*, **14**, 4273-4279.
- Piscaglia, A.C., Novi, M., Campanale, M. and Gasbarrini, A. (2008) Stem cell-based therapy in gastroenterology and hepatology. *Minim Invasive Ther Allied Technol*, **17**, 100-118.
- Planas-Silva, M.D., Shang, Y., Donaher, J.L., Brown, M. and Weinberg, R.A. (2001) AIB1 enhances estrogen-dependent induction of cyclin D1 expression. *Cancer Res*, **61**, 3858-3862.
- Popivanova, B.K., Kitamura, K., Wu, Y., Kondo, T., Kagaya, T., Kaneko, S., Oshima, M., Fujii, C. and Mukaida, N. (2008) Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest*, **118**, 560-570.
- Prochazka, L., Tesarik, R. and Turanek, J. (2014) Regulation of alternative splicing of CD44 in cancer. *Cell Signal*, **26**, 2234-2239.
- Qian, B.Z. and Pollard, J.W. (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, **141**, 39-51.
- Qin, L., Liao, L., Redmond, A., Young, L., Yuan, Y., Chen, H., O'Malley, B.W. and Xu, J. (2008) The AIB1 oncogene promotes breast cancer metastasis by activation of PEA3-mediated matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 expression. *Mol Cell Biol*, **28**, 5937-5950.

- Qutob, M.S., Bhattacharjee, R.N., Pollari, E., Yee, S.P. and Torchia, J. (2002) Microtubule-dependent subcellular redistribution of the transcriptional coactivator p/CIP. *Mol Cell Biol*, **22**, 6611-6626.
- Qwarnstrom, E.E., Ostberg, C.O., Turk, G.L., Richardson, C.A. and Bomsztyk, K. (1994) Fibronectin attachment activates the NF-kappa B p50/p65 heterodimer in fibroblasts and smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **269**, 30765-30768.
- Robinson, E.E., Zazzali, K.M., Corbett, S.A. and Foty, R.A. (2003) Alpha5beta1 integrin mediates strong tissue cohesion. *J Cell Sci*, **116**, 377-386.
- Rock, J.R., Gao, X., Xue, Y., Randell, S.H., Kong, Y.Y. and Hogan, B.L. (2011) Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. *Cell Stem Cell*, **8**, 639-648.
- Rosen, J.M. and Jordan, C.T. (2009) The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science*, **324**, 1670-1673.
- Rossi, D.J., Jamieson, C.H. and Weissman, I.L. (2008) Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell*, **132**, 681-696.
- Rubio, M.F., Fernandez, P.N., Alvarado, C.V., Panelo, L.C., Grecco, M.R., Colo, G.P., Martinez-Noel, G.A., Micenmacher, S.M. and Costas, M.A. (2012) Cyclin D1 is a NF-kappaB corepressor. *Biochim Biophys Acta*, **1823**, 1119-1131.
- Rubio, M.F., Verbajh, S., Cafferata, E.G., Quagliano, A., Colo, G.P., Nojek, I.M., Kordon, E.C., Nahmod, V.E. and Costas, M.A. (2006) TNF-alpha enhances estrogen-induced cell proliferation of estrogen-dependent breast tumor cells through a complex containing nuclear factor-kappa B. *Oncogene*, **25**, 1367-1377.
- Russell, S.J. and Kahn, C.R. (2007) Endocrine regulation of ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 681-691.
- Sabio, G. and Davis, R.J. (2014) TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin Immunol*, **26**, 237-245.
- Sakaguchi, H., Fujimoto, J., Sun, W.S. and Tamaya, T. (2007) Clinical implications of steroid receptor coactivator (SRC)-3 in uterine endometrial cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **104**, 237-240.
- Sakakura, C., Hagiwara, A., Yasuoka, R., Fujita, Y., Nakanishi, M., Masuda, K., Kimura, A., Nakamura, Y., Inazawa, J., Abe, T. and Yamagishi, H. (2000) Amplification and over-expression of the AIB1 nuclear receptor co-activator gene in primary gastric cancers. *Int J Cancer*, **89**, 217-223.
- Salkowski, C.A. and Balish, E. (1991) Inflammatory responses to cryptococcosis in congenitally athymic mice. *J Leukoc Biol*, **49**, 533-541.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. and Brivanlou, A.H. (2004) Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med*, **10**, 55-63.
- Sceneay, J., Smyth, M.J. and Moller, A. (2013) The pre-metastatic niche: finding common ground. *Cancer Metastasis Rev*, **32**, 449-464.
- Schwitalla, S., Fingerle, A.A., Cammareri, P., Nebelsiek, T., Goktuna, S.I., Ziegler, P.K., Canli, O., Heijmans, J., Huels, D.J., Moreaux, G., Rupec, R.A., Gerhard, M., Schmid, R., Barker, N., Clevers, H., Lang, R., Neumann, J., Kirchner, T., Taketo, M.M., van den Brink, G.R., Sansom, O.J., Arkan, M.C. and Greten, F.R. (2013) Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell*, **152**, 25-38.
- Seigel, G.M. and Campbell, L.M. (2004) High-throughput microtiter assay for Hoechst 33342 dye uptake. *Cytotechnology*, **45**, 155-160.
- Semenza, G.L. (1999) Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 551-578.
- Semenza, G.L. (2001) HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell*, **107**, 1-3.
- Semenza, G.L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **3**, 721-732.
- Semenza, G.L. (2010a) Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*, **29**, 625-634.
- Semenza, G.L. (2010b) HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev*, **20**, 51-56.
- Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E.R. and Morrison, S.J. (2009) Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*, **138**, 822-829.

- Sharma, D., Brummel-Ziedins, K.E., Bouchard, B.A. and Holmes, C.E. (2014) Platelets in tumor progression: a host factor that offers multiple potential targets in the treatment of cancer. *J Cell Physiol*, **229**, 1005-1015.
- Shats, I., Milyavsky, M., Tang, X., Stambolsky, P., Erez, N., Brosh, R., Kogan, I., Braunstein, I., Tzukerman, M., Ginsberg, D. and Rotter, V. (2004) p53-dependent down-regulation of telomerase is mediated by p21waf1. *J Biol Chem*, **279**, 50976-50985.
- Shay, J.W. and Wright, W.E. (2000) Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 72-76.
- Shay, J.W. and Wright, W.E. (2010) Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells. *FEBS Lett*, **584**, 3819-3825.
- Shen, Y. and Cao, D. (2012) Hepatocellular carcinoma stem cells: origins and roles in hepatocarcinogenesis and disease progression. *Front Biosci (Elite Ed)*, **4**, 1157-1169.
- Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A. and Greene, G.L. (1998) The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, **95**, 927-937.
- Shimazui, T., Schalken, J.A., Kawai, K., Kawamoto, R., van Bockhoven, A., Oosterwijk, E. and Akaza, H. (2004) Role of complex cadherins in cell-cell adhesion evaluated by spheroid formation in renal cell carcinoma cell lines. *Oncol Rep*, **11**, 357-360.
- Shipitsin, M., Campbell, L.L., Argani, P., Weremowicz, S., Bloushtain-Qimron, N., Yao, J., Nikolskaya, T., Serebryiskaya, T., Beroukhim, R., Hu, M., Halushka, M.K., Sukumar, S., Parker, L.M., Anderson, K.S., Harris, L.N., Garber, J.E., Richardson, A.L., Schnitt, S.J., Nikolsky, Y., Gelman, R.S. and Polyak, K. (2007) Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell*, **11**, 259-273.
- Shishodia, S. and Aggarwal, B.B. (2004) Guggulsterone inhibits NF-kappaB and IkappaBalpha kinase activation, suppresses expression of anti-apoptotic gene products, and enhances apoptosis. *J Biol Chem*, **279**, 47148-47158.
- Shook, D. and Keller, R. (2003) Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev*, **120**, 1351-1383.
- Singh, A. and Settleman, J. (2010) EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, **29**, 4741-4751.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D. and Dirks, P.B. (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, **432**, 396-401.
- Skvortzov, D.A., Rubzova, M.P., Zvereva, M.E., Kiselev, F.L. and Donzova, O.A. (2009) The regulation of telomerase in oncogenesis. *Acta Naturae*, **1**, 51-67.
- Sleeman, J.P. (2012) The metastatic niche and stromal progression. *Cancer Metastasis Rev*, **31**, 429-440.
- Smith, S.M., Lyu, Y.L. and Cai, L. (2014) NF-kappaB affects proliferation and invasiveness of breast cancer cells by regulating CD44 expression. *PLoS One*, **9**, e106966.
- Smogorzewska, A. and de Lange, T. (2004) Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem*, **73**, 177-208.
- Soltysova, A., Altanerova, V. and Altaner, C. (2005) Cancer stem cells. *Neoplasma*, **52**, 5.
- Sosa, M.S., Bragado, P. and Aguirre-Ghiso, J.A. (2014) Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer*, **14**, 611-622.
- Sovak, M.A., Bellas, R.E., Kim, D.W., Zanieski, G.J., Rogers, A.E., Traish, A.M. and Sonenshein, G.E. (1997) Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest*, **100**, 2952-2960.
- Stathopoulos, G.T., Sherrill, T.P., Han, W., Sadikot, R.T., Yull, F.E., Blackwell, T.S. and Fingleton, B. (2008) Host nuclear factor-kappaB activation potentiates lung cancer metastasis. *Mol Cancer Res*, **6**, 364-371.
- Steindler, D.A. (2007) Stem cells, regenerative medicine, and animal models of disease. *ILAR J*, **48**, 323-338.
- Strong, A.L., Burow, M.E., Gimble, J.M. and Bunnell, B.A. (2015) Concise review: The obesity cancer paradigm: exploration of the interactions and crosstalk with adipose stem cells. *Stem Cells*, **33**, 318-326.
- Suen, C.S., Berrodin, T.J., Mastroeni, R., Cheskis, B.J., Lyttle, C.R. and Frail, D.E. (1998) A transcriptional coactivator, steroid receptor coactivator-3, selectively augments steroid receptor transcriptional activity. *J Biol Chem*, **273**, 27645-27653.
- Sumitomo, M., Tachibana, M., Ozu, C., Asakura, H., Murai, M., Hayakawa, M., Nakamura, H., Takayanagi, A. and Shimizu, N. (1999) Induction of apoptosis of cytokine-producing

- bladder cancer cells by adenovirus-mediated IkappaBalpha overexpression. *Hum Gene Ther*, **10**, 37-47.
- Swanton, C. (2012) Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. *Cancer Res*, **72**, 4875-4882.
- Symonds, H., Krall, L., Remington, L., Saenz-Robles, M., Lowe, S., Jacks, T. and Van Dyke, T. (1994) p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell*, **78**, 703-711.
- Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M. and Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc*, **2**, 3081-3089.
- Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**, 663-676.
- Takeshita, A., Cardona, G.R., Koibuchi, N., Suen, C.S. and Chin, W.W. (1997) TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem*, **272**, 27629-27634.
- Talmadge, J.E. (2010) Models of metastasis in drug discovery. *Methods Mol Biol*, **602**, 215-233.
- Talmadge, J.E. and Fidler, I.J. (2010) AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res*, **70**, 5649-5669.
- Tan, K., Goldstein, D., Crowe, P. and Yang, J.L. (2013) Uncovering a key to the process of metastasis in human cancers: a review of critical regulators of anoikis. *J Cancer Res Clin Oncol*, **139**, 1795-1805.
- Tavaluc, R.T., Hart, L.S., Dicker, D.T. and El-Deiry, W.S. (2007) Effects of low confluency, serum starvation and hypoxia on the side population of cancer cell lines. *Cell Cycle*, **6**, 2554-2562.
- Taylor, C.T. (2008) Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor-kappaB in hypoxic inflammation. *J Physiol*, **586**, 4055-4059.
- Tchkonia, T., Zhu, Y., van Deursen, J., Campisi, J. and Kirkland, J.L. (2013) Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest*, **123**, 966-972.
- Telleria, C.M. (2013) Repopulation of ovarian cancer cells after chemotherapy. *Cancer Growth Metastasis*, **6**, 15-21.
- Thiery, J.P. (2009) [Epithelial-mesenchymal transitions in cancer onset and progression]. *Bull Acad Natl Med*, **193**, 1969-1978; discussion 1978-1969.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y. and Nieto, M.A. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, **139**, 871-890.
- Thiery, J.P. and Sleeman, J.P. (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 131-142.
- Thoma, C.R., Zimmermann, M., Agarkova, I., Kelm, J.M. and Krek, W. (2014) 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Adv Drug Deliv Rev*, **69-70**, 29-41.
- Torchia, J., Glass, C. and Rosenfeld, M.G. (1998) Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 373-383.
- Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1997) The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature*, **387**, 677-684.
- Torres-Arzayus, M.I., Font de Mora, J., Yuan, J., Vazquez, F., Bronson, R., Rue, M., Sellers, W.R. and Brown, M. (2004) High tumor incidence and activation of the PI3K/AKT pathway in transgenic mice define AIB1 as an oncogene. *Cancer Cell*, **6**, 263-274.
- Tysnes, B.B. and Bjerkvig, R. (2007) Cancer initiation and progression: involvement of stem cells and the microenvironment. *Biochim Biophys Acta*, **1775**, 283-297.
- United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research, U. (1998) United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia (Second Edition). *Br J Cancer*, **77**, 1-10.
- Vakkila, J. and Lotze, M.T. (2004) Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat Rev Immunol*, **4**, 641-648.
- van Kempen, L.C., de Visser, K.E. and Coussens, L.M. (2006) Inflammation, proteases and cancer. *Eur J Cancer*, **42**, 728-734.
- Van Keymeulen, A., Rocha, A.S., Ousset, M., Beck, B., Bouvencourt, G., Rock, J., Sharma, N., Dekoninck, S. and Blanpain, C. (2011) Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature*, **479**, 189-193.

- Velarde, M.C., Demaria, M. and Campisi, J. (2013) Senescent cells and their secretory phenotype as targets for cancer therapy. *Interdiscip Top Gerontol*, **38**, 17-27.
- Vitale, M., Cantoni, C., Pietra, G., Mingari, M.C. and Moretta, L. (2014) Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol*, **44**, 1582-1592.
- Voegel, J.J., Heine, M.J., Zechel, C., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1996) TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *Embo J*, **15**, 3667-3675.
- Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A.J. (2000) Surfing the p53 network. *Nature*, **408**, 307-310.
- Wang, H., Wang, H.S., Zhou, B.H., Li, C.L., Zhang, F., Wang, X.F., Zhang, G., Bu, X.Z., Cai, S.H. and Du, J. (2013) Epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by TNF-alpha requires AKT/GSK-3beta-mediated stabilization of snail in colorectal cancer. *PLoS One*, **8**, e56664.
- Wang, Y., Wu, M.C., Sham, J.S., Zhang, W., Wu, W.Q. and Guan, X.Y. (2002) Prognostic significance of c-myc and AIB1 amplification in hepatocellular carcinoma. A broad survey using high-throughput tissue microarray. *Cancer*, **95**, 2346-2352.
- Werbajh, S., Nojek, I., Lanz, R. and Costas, M.A. (2000) RAC-3 is a NF-kB coactivator. *Febs Letters*, **485**, 195-199.
- Wood, L.A. and Jewett, M.A. (2007) Renal cell carcinoma: currently the most interesting genitourinary malignancy. *Can Urol Assoc J*, **1**, S74-76.
- Workman, P., Aboagye, E.O., Balkwill, F., Balmain, A., Bruder, G., Chaplin, D.J., Double, J.A., Everitt, J., Farningham, D.A., Glennie, M.J., Kelland, L.R., Robinson, V., Stratford, I.J., Tozer, G.M., Watson, S., Wedge, S.R. and Eccles, S.A. (2010) Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br J Cancer*, **102**, 1555-1577.
- Wu, H. and Lozano, G. (1994) NF-kappa B activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. *J Biol Chem*, **269**, 20067-20074.
- Wu, L., Bayle, J.H., Elenbaas, B., Pavletich, N.P. and Levine, A.J. (1995) Alternatively spliced forms in the carboxy-terminal domain of the p53 protein regulate its ability to promote annealing of complementary single strands of nucleic acids. *Mol Cell Biol*, **15**, 497-504.
- Wu, R.C., Qin, J., Hashimoto, Y., Wong, J., Xu, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (2002) Regulation of SRC-3 (pCIP/ACTR/AIB-1/RAC-3/TRAM-1) Coactivator activity by I kappa B kinase. *Mol Cell Biol*, **22**, 3549-3561.
- Wu, Y., Deng, J., Rychahou, P.G., Qiu, S., Evers, B.M. and Zhou, B.P. (2009) Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell*, **15**, 416-428.
- Wu, Y., Starzinski-Powitz, A. and Guo, S.W. (2010) Constitutive and tumor necrosis factor-alpha-stimulated activation of nuclear factor-kappaB in immortalized endometriotic cells and their suppression by trichostatin A. *Gynecol Obstet Invest*, **70**, 23-33.
- Wu, Y. and Zhou, B.P. (2010) TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer*, **102**, 639-644.
- Wyckoff, J.B., Wang, Y., Lin, E.Y., Li, J.F., Goswami, S., Stanley, E.R., Segall, J.E., Pollard, J.W. and Condeelis, J. (2007) Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res*, **67**, 2649-2656.
- Xie, D., Sham, J.S., Zeng, W.F., Lin, H.L., Bi, J., Che, L.H., Hu, L., Zeng, Y.X. and Guan, X.Y. (2005) Correlation of AIB1 overexpression with advanced clinical stage of human colorectal carcinoma. *Hum Pathol*, **36**, 777-783.
- Xu, J., Liao, L., Ning, G., Yoshida-Komiya, H., Deng, C. and O'Malley, B.W. (2000) The steroid receptor coactivator SRC-3 (pCIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6379-6384.
- Xu, Y., Chen, Q., Li, W., Su, X., Chen, T., Liu, Y., Zhao, Y. and Yu, C. (2010) Overexpression of transcriptional coactivator AIB1 promotes hepatocellular carcinoma progression by enhancing cell proliferation and invasiveness. *Oncogene*, **29**, 3386-3397.
- Yan, J., Tsai, S.Y. and Tsai, M.J. (2006) SRC-3/AIB1: transcriptional coactivator in oncogenesis. *Acta Pharmacol Sin*, **27**, 387-394.
- Yang, M.H., Hsu, D.S., Wang, H.W., Wang, H.J., Lan, H.Y., Yang, W.H., Huang, C.H., Kao, S.Y., Zeng, C.H., Tai, S.K., Chang, S.Y., Lee, O.K. and Wu, K.J. (2010) Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*, **12**, 982-992.
- Yang, Z. and Klionsky, D.J. (2010) Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*, **12**, 814-822.

- Yeung, P.L., Zhang, A. and Chen, J.D. (2006) Nuclear localization of coactivator RAC3 is mediated by a bipartite NLS and importin alpha3. *Biochem Biophys Res Commun*, **348**, 13-24.
- Yilmaz, M. and Christofori, G. (2010) Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res*, **8**, 629-642.
- Yin, L., Hubbard, A.K. and Giardina, C. (2000) NF-kappa B regulates transcription of the mouse telomerase catalytic subunit. *J Biol Chem*, **275**, 36671-36675.
- Yook, J.I., Li, X.Y., Ota, I., Hu, C., Kim, H.S., Kim, N.H., Cha, S.Y., Ryu, J.K., Choi, Y.J., Kim, J., Fearon, E.R. and Weiss, S.J. (2006) A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nat Cell Biol*, **8**, 1398-1406.
- Yu, C., York, B., Wang, S., Feng, Q., Xu, J. and O'Malley, B.W. (2007) An essential function of the SRC-3 coactivator in suppression of cytokine mRNA translation and inflammatory response. *Mol Cell*, **25**, 765-778.
- Zhang, D.Y., Pan, Y., Zhang, C., Yan, B.X., Yu, S.S., Wu, D.L., Shi, M.M., Shi, K., Cai, X.X., Zhou, S.S., Wang, J.B., Pan, J.P. and Zhang, L.H. (2013) Wnt/beta-catenin signaling induces the aging of mesenchymal stem cells through promoting the ROS production. *Mol Cell Biochem*, **374**, 13-20.
- Zhang, K., Rodriguez-Aznar, E., Yabuta, N., Owen, R.J., Mingot, J.M., Nojima, H., Nieto, M.A. and Longmore, G.D. (2012a) Lats2 kinase potentiates Snail1 activity by promoting nuclear retention upon phosphorylation. *Embo J*, **31**, 29-43.
- Zhang, Y., Toy, K.A. and Kleer, C.G. (2012b) Metaplastic breast carcinomas are enriched in markers of tumor-initiating cells and epithelial to mesenchymal transition. *Mod Pathol*, **25**, 178-184.
- Zhang, Z., Huang, L., Zhao, W. and Rigas, B. (2010) Annexin 1 induced by anti-inflammatory drugs binds to NF-kappaB and inhibits its activation: anticancer effects in vitro and in vivo. *Cancer Res*, **70**, 2379-2388.
- Zhao, T., Zhang, Z.N., Rong, Z. and Xu, Y. (2011) Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*, **474**, 212-215.
- Zhao, X.Y., Li, W., Lv, Z., Liu, L., Tong, M., Hai, T., Hao, J., Guo, C.L., Ma, Q.W., Wang, L., Zeng, F. and Zhou, Q. (2009) iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, **461**, 86-90.
- Zhou, G., Hashimoto, Y., Kwak, I., Tsai, S.Y. and Tsai, M.-J. (2003) Role of the steroid receptor coactivator SRC-3 in cell growth. *Molecular and Cellular Biology*, **23**, 7742-7755.
- Zhou, H.J., Yan, J., Luo, W., Ayala, G., Lin, S.H., Erdem, H., Ittmann, M., Tsai, S.Y. and Tsai, M.J. (2005) SRC-3 is required for prostate cancer cell proliferation and survival. *Cancer Res*, **65**, 7976-7983.
- Zhou, N., Wu, X., Yang, B., Yang, X., Zhang, D. and Qing, G. (2014) Stem cell characteristics of dormant cells and cisplatininduced effects on the stemness of epithelial ovarian cancer cells. *Mol Med Rep*, **10**, 2495-2504.
- Zink, D., Fischer, A.H. and Nickerson, J.A. (2004) Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer*, **4**, 677-687.

